

# **Leptospiren bei Freigängerkatzen in Deutschland:**

**Prävalenz von Ausscheidung und Antikörpern**

von Sonia Weis

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Leptospiren bei Freigängerkatzen in  
Deutschland:  
Prävalenz von Ausscheidung und Antikörpern**

von Sonia Weis

aus Bozen

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

meiner Mutter

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
1.	Ätiologie der felines Leptospirose .....	2
1.1.	Morphologie und Eigenschaften .....	2
1.2.	Taxonomie .....	5
1.2.1.	Antigenetische Klassifizierung .....	8
1.2.2.	Molekulargenetische Klassifizierung .....	9
2.	Epidemiologie der felines Leptospirose .....	10
2.1.	Wirtsspektrum und Reservoir .....	10
2.2.	Übertragung .....	11
2.3.	Geografische Verbreitung .....	13
3.	Prävalenz der felines Leptospirose .....	13
3.1.	Antikörperprävalenz bei der Katze .....	13
3.2.	Leptospirurie bei der Katze .....	14
4.	Pathogenese der felines Leptospirose .....	14
4.1.	Organmanifestation .....	15
4.2.	Krankheitsverlauf .....	16
4.2.1.	Experimentelle Infektionen .....	16
4.2.2.	Natürliche Infektionen .....	18
4.2.2.1.	Fallberichte .....	18
4.2.2.2.	Zusammenhang zwischen Infektionen und Symptomen .....	23
5.	Diagnose einer Infektion mit Leptospiren bei der Katze .....	23
5.1.	Direkter Erregernachweis .....	23
5.1.1.	Mikroskopischer Erregernachweis .....	24
5.1.2.	Kultureller Nachweis .....	24
5.1.3.	Polymerasekettenreaktion .....	25
5.1.3.1.	Primerwahl .....	25
5.1.3.2.	Sensitivität und Spezifität .....	25
5.2.	Indirekte Nachweismethoden: Mikroagglutinationstest .....	27
6.	Therapie der felines Leptospirose .....	29
7.	Leptospirose als Zoonose .....	30

---

<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>32</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>50</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>52</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>53</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>68</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

%	Prozent
≥	Vergleichszeichen: größer als oder gleich
<	Vergleichszeichen: kleiner als
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CNE	chronische Nierenerkrankung
Ct	cycle threshold (Cycle-Threshold, Schwellenwert-Zyklus)
DIC	disseminated intravascular coagulopathy (disseminierte intravasale Koagulopathie)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EKH	Europäisch Kurzhaar
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunabsorptionstest)
g	Erdbeschleunigung
IgM	Immunglobulin M
Lip	Lipoprotein
LMU	Ludwig-Maximilians-Universitaet (Ludwig-Maximilians-Universität)
MAT	microscopic agglutination test (Mikroagglutinationstest)
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
ml	Milliliter
MLST	multilocus sequence typing (Multilokus-Sequenztypisierung)
mmol/l	Millimol pro Liter
n. a.	nicht angegeben
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
OMP	outer membrane proteine (Protein der äußeren Membran)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)



---

PD	Polydipsie
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
PU	Polyurie
qPCR	quantitative real-time PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
spp.	species (Spezies)
SPF	specific pathogen-free (spezifisch pathogenfrei)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
USG	urine specific gravity (urinspezifisches Gewicht)
x	Multiplikationszeichen
z. B.	zum Beispiel

## **I. EINLEITUNG**

Die Leptospirose ist eine durch pathogene Leptospiren hervorgerufene, weltweit verbreitete Erkrankung. Leptospiren können über 150 Säugetierarten einschließlich des Menschen infizieren (LEVETT, 2001; SYKES et al., 2011). Auch Katzen können sich mit Leptospiren infizieren und Antikörper bilden. Infizierte Katzen zeigen meist keine Symptome (FESSLER & MORTER, 1964; HARKNESS et al., 1970; LARSSON et al., 1985). Sie können jedoch bis zu mehrere Wochen nach experimenteller Infektion den Erreger über den Urin ausscheiden (FESSLER & MORTER, 1964; LARSSON et al., 1984). Auch bei natürlich infizierten Katzen wurden Leptospiren in den Nieren (DESVARS et al., 2013) und im Urin (HARKNESS et al., 1970) nachgewiesen. In Kanada, den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Taiwan wurde kürzlich Desoxyribonukleinsäure (DNA) pathogener Leptospiren im Urin natürlich infizierter Katzen gefunden. Die Prävalenz lag bei 3,4 % (in Kanada) (RODRIGUEZ et al., 2014), 11,7 % (in den USA) (FENIMORE et al., 2012) und 67,8 % (in Taiwan) (CHAN et al., 2014). In Europa gibt es bislang keine Untersuchungen zum Vorkommen von Leptospiren im Urin bei Katzen im Feld. Nach einer Erhebung aus dem Jahre 2014 hatten 8,7 Millionen Menschen in Deutschland mindestens eine Katze als Haustier (STATISTA, 2015). Damit könnte der Katze eine wichtige Rolle als Überträger der Leptospirose auf den Menschen zukommen.

Ziel dieser kumulativen Arbeit war es daher, herauszufinden, ob Katzen in Deutschland DNA pathogener Leptospiren über den Urin ausscheiden. Hierfür wurde der Urin von 215 Katzen, die an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) in München vorgestellt wurden, mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (quantitative real-time PCR, qPCR) untersucht. Zusätzlich wurde der Antikörperstatus dieser Katzen mittels Mikroagglutinationstest (MAT) ermittelt.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Ätiologie der feline Leptospirose

Die ersten Aufzeichnungen über die Leptospirose beim Menschen stammen aus dem Jahr 1886 (WEIL, 1886). *Leptospira (L.) interrogans sensu stricto* Serovar Icterohaemorrhagiae wurde 1915 als Ursache für die sogenannte Weil'sche Krankheit erkannt (INADA & IDO, 1915). Eine Isolation des Serovars Icterohaemorrhagiae bei der Katze gelang erstmals 23 Jahre später (MERTENS, 1938). Die Serovare Bataviae, Javanica (ESSEVALD & COLLIER, 1938), Grippotyphosa (VYSOTOSKI et al., 1960) und Pomona (GORDON SMITH et al., 1961; HARKNESS et al., 1970) konnten in den folgenden Jahren ebenfalls bei der Katze isoliert werden. Mittels MAT wurden weitere *Leptospira*-Serovare bei der Katze nachgewiesen (Tabelle 1). Auch die Genospezies *L. interrogans* und *L. kirschneri* konnten vor Kurzem bei der Katze gefunden werden (FENIMORE et al., 2012; CHAN et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2014) (Tabelle 2).

#### 1.1. Morphologie und Eigenschaften

Leptospiren sind gramnegative Bakterien. Sie besitzen eine innere Zytoplasmamembran, eine Mureinhülle aus Peptidoglykanen und eine äußere Lipidmembran. Zwischen der inneren und der äußeren Membran liegt der periplasmatische Raum. In der äußeren Membran befinden sich Lipopolysaccharide und Lipoproteine (outer membrane proteins, OMP), unter anderem Porine. Porine ermöglichen einen Stoffaustausch zwischen periplasmatischem Raum und Umwelt. Dadurch werden Leptospiren empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel (z. B.) Salz und Trockenheit (PLANK & DEAN, 2000; BHARTI et al., 2003).

Das Aussehen der Leptospiren ähnelt dem anderer Spirochäten. Sie sind 6,0 bis 25,0 µm lang, 0,1 bis 0,2 µm breit und korkenzieherartig geformt. Die Enden sind in flüssigen Medien zumeist abgebogen, sodass Leptospiren die charakteristische Form eines Hakens oder eines Kleiderbügels annehmen. In Geweben treten Leptospiren häufig in Form von Granula auf (PLANK & DEAN, 2000; BHARTI et al., 2003).

**Tabelle 1: Prävalenz von Antikörpern gegen *Leptospira* species bei der Katze**

Anzahl untersuchte Katzen	Antikörper-positive Katzen (%)	Test-trennwert*	nachgewiesene Serovare	Region	Studie
225	20 (8,9)	≥ 1:24	Ballum, Balanica, Canicola, Copenhageni, Hardjo, Pomona	North Island; Neuseeland	SHOPHET, 1979
11	2 (18,2)	≥ 1:24	Ballum, Pomona	North Island; Neuseeland	HATHAWAY & BLACKMORE, 1981
165	33 (20,0)	≥ 1:50	Autumnalis, Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Pomona, Sejroe, Tarassovi	Gießen; Deutschland	BÄTZA & WEISS, 1987
87	8 (9,2)	≥ 1:30	Autumnalis, Hardjo, Icterohaemorrhagiae	Glasgow; Schottland	AGUNLOYE & NASH, 1996
97	47 (48,5)	≥ 1:40	Australis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pyrogenes, Sejroe	Nantes; Frankreich	LUCIANI, 2004
99	33 (33,3)	≥ 1:50	Bachmati, Ballum, Bataviae, Bratislava, Canicola, Panama, Pyrogenes	Thessaloniki; Griechenland	MYLONAKIS et al., 2005
44	6 (13,6)	≥ 1:100	Ballum, Icterohaemorrhagiae	Andalusien; Spanien	MILLAN et al., 2009
63	3 (4,8)	≥ 1:100	Autumnalis, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Pomona	Massachusetts; USA	MARKOVICH et al., 2012
40	10 (25,0)	≥ 1:100	Autumnalis, Bratislava	Montréal; Kanada	LAPOINTE et al., 2013
30	8 (26,7)	≥ 1:100	Panama	Réunion Island (französische Insel im Indischen Ozean)	DESVARIS et al., 2013
240	26 (10,8)	≥ 1:100	Bratislava, Grippotyphosa, Pomona	Montréal; Kanada	RODRIGUEZ et al., 2014
161	43 (26,7)	≥ 1:100	Australis, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Pyrogenes	Belgrad; Serbien	OBRENOVIC et al., 2014
225	21 (9,3)	≥ 1:100	Australis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Pyrogenes, Shermani	Südtaiwan; China	CHAN et al., 2014
124	10 (8,1)	≥ 1:100	Autumnalis, Bataviae, Canicola, Grippotyphosa, Javanica, Sejroe, Wolffi	Südchile	AZOCÀR-AEDO et al., 2014
141	12 (8,5)	≥ 1:100	Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae	Colorado, New York, Ohio, Oklahoma, South Dakota, West Virginia; USA	SHROPSHIRE et al., 2015
129	7 (5,4)	≥ 1:200	Pomona	Paraíba; Brasilien	BRASIL et al., 2015
89	12 (13,5)	≥ 1:100	Australis, Autumnalis, Bratislava, Copenhageni, Grippotyphosa, Javanica, Pomona, Pyrogenes	Berlin; Deutschland	ROSE et al., 2016

USA, United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika);

\* Der Testtrennwert bestimmt, ab welchem Wert ein Ergebnis als positiv gewertet wird. Liegt der Testtrennwert bei ≥ 1:100, werden Ergebnisse mit einem Titer ≥ 1:100 als positiv und Ergebnisse mit einem Titer < 1:100 als negativ gewertet.

**Tabelle 2: Prävalenz der Desoxyribonukleinsäure-Ausscheidung pathogener *Leptospira* species bei der Katze**

Anzahl untersuchte Katzen	PCR-positive Katzen (%)	PCR	Primer	Genospezies	Region	Studie
238	8 (3,4)	konventionell	G1/G2, B64-I/B64-II	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>	Montréal; Kanada	RODRIGUEZ et al., 2014
85	10 (11,7)	qPCR	16S-rRNA	<i>L. interrogans</i> Serovar Hardjo-prajitno	Colorado; USA	FENIMORE et al., 2012
118	80 (67,8)	konventionell	G1/G2, 16S-rRNA	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>	Taiwan; China	CHAN et al., 2014

DNA, deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure); *L.*, *Leptospira*; PCR, polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion); qPCR, quantitative real-time PCR (quantitative Echtzeit-PCR); rRNA, ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure); spp., species (Spezies); USA, United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)

Leptospiren besitzen wie andere Spirochäten Endoflagellen (PLANK & DEAN, 2000; BHARTI et al., 2003; CHARON et al., 2012). Diese Endoflagellen bilden das Axialfilament, um das sich der protoplasmatische Zylinder, der Zellkörper der Leptospiren, windet. Zylinder und Axialfilament werden von einer gemeinsamen Hülle umgeben (BHARTI et al., 2003). Durch Kontraktion der Endoflagellen bewegen sich die Leptospiren fort. Die Fortbewegung erfolgt als Rotation um die eigene Achse, geradlinig oder zirkulär (BHARTI et al., 2003). Durch Rotation dringen Leptospiren auch aktiv durch Haut und Schleimhäute in den Wirt ein (KOBAYASHI, 2001; LEVETT, 2001).

Leptospiren überleben und wachsen bei Temperaturen zwischen 0 und 42 Grad Celsius (°C). Das Temperaturoptimum liegt bei etwa 28 °C bis 30 °C (LEVETT, 2001; GREENE et al., 2006). Deshalb verbreiten Leptospiren sich hierzulande vorwiegend in den warmen Sommer- und Herbstmonaten (JANSEN et al., 2005; GEISEN et al., 2007; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2012). Leptospiren vermehren sich natürlicherweise nur innerhalb eines Wirtes (GREENE et al., 2006). Sie bevorzugen einen neutralen pH-Wert von 6,8 bis 7,6. Im unverdünnten, sauren Urin, der typisch ist für fleischfressende Tiere, überleben Leptospiren deshalb nur kurze Zeit. Wird der Urin verdünnt oder gelangen die Erreger in Gewässer mit neutralem pH, haben sie ein optimales Medium zum Überleben gefunden. Auch leicht alkalischer Urin von pflanzenfressenden Tieren stellt ein gutes Medium für Leptospiren dar. Leptospiren bevorzugen außerdem ein feuchtes Milieu (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; GREENE et al., 2006).

## 1.2. Taxonomie

Die Gattung *Leptospira* gehört zur Familie *Leptospiraceae* (Ordnung *Spirochaetales*) (PLANK & DEAN, 2000; BHARTI et al., 2003). Die antigenetische Klassifizierung erfasst pathogene Serovare unter der Spezies *L. interrogans* sensu lato und saprophytäre Serovare unter der Spezies *L. biflexa* sensu lato (LEVETT, 2001). Antigenetisch ähnliche Serovare werden Serogruppen zugeordnet (PLANK & DEAN, 2000; LEVETT, 2001). Zunehmend setzt sich jedoch die genotypische Klassifizierung durch, welche Genospezies nach dem Verwandtschaftsgrad der DNA unterteilt (Tabelle 3). Die genotypische Einteilung entspricht nicht der antigenetischen Einteilung. Serovare derselben Serogruppe können beispielsweise verschiedenen Genospezies angehören (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003).



**Tabelle 3: Stammbaum der Gattung *Leptospira* (Teil 2) (modifiziert nach LEVETT, 2001; modifiziert nach BHARTI et al., 2003)**

<b>Genospezies</b>	<i>L. broomi</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. biflexa</i> sensu stricto	<i>L. vanthielii</i>	<i>L. terpstrae</i>	<i>L. meyeri</i>	<i>L. wolbachii</i>	<i>L. yanagawae</i>	<i>L. kmetyi</i>
<b>Pathogenität</b>	opportunistisch	opportunistisch	opportunistisch	saprophytär	saprophytär	saprophytär	saprophytär	saprophytär	saprophytär	saprophytär
<b>Serogruppen</b>	n. a.	n. a.	n. a.	Andamana Patoc Semaranga	Holland	Icterohaemorrhagiae	Hardjo Javanica Mini Ranarum Sejroe Semaranga	Codice	Semaranga	n. a.

n. a., nicht angegeben; *L.*, *Leptospira*



### 1.2.1. Antigenetische Klassifizierung

Bis in die Neunziger des 20. Jahrhunderts wurde die Gattung *Leptospira* in die pathogene Spezies *L. interrogans* sensu lato und die apathogene Spezies *L. biflexa* sensu lato unterteilt (LEVETT, 2001). Die Unterscheidung der beiden Spezies gelang durch morphologische Besonderheiten und unterschiedliche Kultivierungsansprüche:

- *L. biflexa* sensu lato wächst im Gegensatz zu *L. interrogans* sensu lato bereits bei einer Temperatur von 13 °C (JOHNSON & HARRIS, 1967).
- *L. biflexa* sensu lato kann im Gegensatz zu *L. interrogans* sensu lato in einem 1-molaren Natriumchlorid (NaCl) sphärische Zellen bilden (LEVETT, 2001).
- *L. interrogans* sensu lato wird im Gegensatz zu *L. biflexa* sensu lato im Wachstum durch 8-Azaguanin, einem Purinanalogon zu Guanin, gehemmt (JOHNSON & ROGERS, 1964).

Die Namen der beiden Spezies wurden mit dem Zusatz sensu lato versehen, da beide Spezies in zahlreiche Serovare eingeteilt werden. Antigenetisch ähnliche Serovare werden in Serogruppen zusammengefasst (Tabelle 4). *L. biflexa* sensu lato umfasst 38 Serogruppen mit insgesamt 65 Serovaren. *L. interrogans* sensu lato umfasst 24 Serogruppen mit insgesamt über 250 Serovaren (LEVETT, 2001; SCHULLER et al., 2015).

**Tabelle 4: Mittels Mikroagglutinationstest nachgewiesene Serovare und Serogruppen bei Hund, Katze und Mensch in Deutschland**

Tierart	Serogruppe	Serovare	Studie
Hund*	Australis	Bratislava	GEISEN et al., 2008
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	
	Pomona	Pomona	
	Sejroe	Hardjo	
	Sejroe	Saxkoebing	
	Sejroe	Sejroe	
	Australis	Australis	MAYER-SCHOLL et al., 2013
	Australis	Bratislava	
	Ballum	Ballum	
	Bataviae	Bataviae	
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	
	Javanica	Javanica	
	Pomona	Pomona	
	Pyrogenes	Pyrogenes	
	Sejroe	Hardjo	

	Sejroe	Saxkoebing	
	Sejroe	Sejroe	
	Australis	Australis	LLEWELLYN et al., 2015
	Australis	Bratislava	
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	
	Pomona	Pomona	
	Sejroe	Saxkoebing	
Katze**	Autumnalis	Autumnalis	BÄTZA & WEISS, 1987
	Ballum	Ballum	
	Canicola	Canicola	
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	
	Tarassovi	Tarassovi	
	Pomona	Pomona	
	Sejroe	Hardjo	
	Sejroe	Sejroe	
	Australis	Australis	ROSE et al., 2016
	Autumnalis	Autumnalis	
	Australis	Bratislava	
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageneri	
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	
	Javanica	Javanica	
	Pomona	Pomona	
	Pyrogenes	Pyrogenes	
Mensch***	Grippotyphosa	Grippotyphosa	DESAI et al., 2009
	Pomona	Pomona	
	Australis	Bratislava	
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageneri	

\* Serogruppen, gegen die geimpft wurde, sind nicht mit aufgeführt; Titer  $\geq 1:100$ ; \*\* Titer  $\geq 1:50$  (BÄTZA & WEISS, 1987), Titer  $\geq 1:100$  (ROSE et al., 2016); \*\*\* Titer  $\geq 1:100$

### 1.2.2. Molekulargenetische Klassifizierung

Seit 1969 werden Leptospiren nach dem Verwandtschaftsgrad der Erbsubstanz unterteilt (HAAPALA et al., 1969). Aktuell gibt es 20 Genospezies. Es wird zwischen pathogenen, opportunistischen und saprophytären Spezies unterschieden (RETTINGER, 2013; SCHULLER et al., 2015) (Tabelle 3).

Die Methoden zur molekulargenetischen Klassifizierung sind im ständigen Wandel. HAAPALA und Mitarbeiter unterschieden insgesamt vier genetische Klassen (HAAPALA et al., 1969). Pathogene Serovare wurden in zwei genetische Klassen mit unterschiedlichen Anteilen an Guanotin und Cytosin in der DNA unterteilt. Apathogene Serovare wurden durch DNA-DNA-Hybridisierung in zwei genetische Klassen eingeteilt. Die Anteile an Guanotin und Cytosin in der DNA war bei allen apathogenen Serovare identisch (HAAPALA et al., 1969). Die DNA-DNA-Hybridisierung wurde auch später zur Einteilung von Leptospiren in genetisch verwandte Spezies aufgegriffen (BRENDLE et al., 1974; YASUDA et al., 1987; RAMADASS et al., 1992; BRENNER et al., 1999). PEROLAT und

Mitarbeiter analysierten die 16S- und 23S-ribosomale-RNA (rRNA) mittels Restriktionsenzymen. Dabei wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und miteinander verglichen (PEROLAT et al., 1990). Die oben aufgelisteten Methoden zur molekulargenetischen Differenzierung wurden letztendlich auch kombiniert (Anteile an Guanosin und Cytosin, DNA-DNA Hybridisierung, Gelelektrophorese, 16S-rRNA Gensequenzen) (LEVETT et al., 2006; MATTHIAS et al., 2008; SLACK et al., 2008; SLACK et al., 2009).

Heutzutage ist die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) Mittel der Wahl für eine Genosequenzierung (AHMED et al., 2006; NEUMEISTER et al., 2009; RETTINGER, 2013). Die MLST ist eine PCR-basierte Methode. Hierbei werden Fragmente verschiedener Genloci in einer PCR-Reaktion vervielfältigt. Zumeist werden sogenannte Haushaltsgene amplifiziert. Haushaltsgene sind für den Organismus essentielle Gene, welche sich über die Zeit kaum verändern. Teilweise werden auch Gene amplifiziert, welche für Strukturproteine der äußeren Membran kodieren (NEUMEISTER et al., 2009; RETTINGER, 2013). Diese Gene werden anschließend beispielsweise mittels Gelelektrophorese analysiert, und die Allele werden erfasst. Die Allelvariationen können dabei in einer internetbasierten Datenbank mit Isolaten aus der ganzen Welt verglichen werden (AHMED et al., 2006; NEUMEISTER et al., 2009). Im Vergleich zu den oben beschriebenen Methoden stellt das MLST eine technisch einfache und reproduzierbare Methode dar (AHMED et al., 2006).

## **2. Epidemiologie der felines Leptospirose**

Die epidemiologische Bedeutung von *Leptospira*-Infektionen bei der Katze ist unklar. Katzen erkranken selten an Leptospirose. Sie können sich jedoch mit Leptospiren infizieren und diese über den Urin ausscheiden (HARTMANN et al., 2013; AZOCAR-AEDO et al., 2014; SCHULLER et al., 2015).

### **2.1. Wirtsspektrum und Reservoir**

Leptospiren befallen über 150 Säugetierarten, einschließlich des Menschen (SYKES et al., 2011). Auch Vögel und poikilotherme Vertebraten, wie beispielsweise Fische, Amphibien und Reptilien, werden infiziert (MINETTE, 1983; EVERARD et al., 1985; JACOBS et al., 1986; LINDTNER-KNIFIC et al., 2013). Reservoirwirte können Leptospiren monate- bis jahrelang beherbergen

ohne klinisch zu erkranken. Die Leptospiren befinden sich dabei an der Oberfläche der proximalen epithelialen Tubuluszellen der Niere (LEVETT, 2001; ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; AZOCAR-AEDO et al., 2014) (Tabelle 5). Häufige Reservoirtiere sind Nagetiere (Ratten und Mäuse) oder Nutztiere (Rinder und Schweine). Allerdings können alle Säugetiere chronische Träger werden und Leptospiren in der Umgebung verbreiten. Der Mensch wurde bisher als nicht relevant für die Verbreitung von Leptospiren in der Umgebung angesehen (BHARTI et al., 2003). Eine Studie aus Peru zeigte jedoch, dass 6 von 314 (1,9 %) asymptomatischen Studienteilnehmern DNA pathogener Leptospiren ausschieden (GANOZA et al., 2010). Infiziert sich ein Wirt mit einem nicht adaptierten Serovar kommt es meist zur Ausbildung klinischer Symptome (BHARTI et al., 2003; GREENE et al., 2006). Auch Reservoirwirte können zu Zufallswirten werden und erkranken (LEVETT, 2001; RETTINGER, 2013). Die Adaption von Serogruppen an bestimmte Reservoirwirte kann zudem je nach geografischer Lage und mit der Zeit variieren (GREENE et al., 2006). Katzen zeigen meist keine klinischen Symptome, wenn sie sich mit Leptospiren infizieren (FESSLER & MORTER, 1964). Als chronischer Träger eines bestimmten *Leptospira*-Serovars konnte die Katze jedoch noch nicht identifiziert werden (GREENE et al., 2006).

**Tabelle 5: Reservoirwirte einiger *Leptospira*-Serovare (modifiziert nach GREENE et al., 2006)**

Serovare	Reservoirwirte
Icterohaemorrhagiae	Ratte
Pomona	Kuh, Schwein, Stinktier, Opossum
Canicola	Hund
Bataviae	Hund, Ratte, Maus
Bratislava	Ratte, Schwein, Pferd
Hardjo	Kuh
Autumnalis	Maus
Ballum	Maus
Copenhagi	Ratte
Australis	Ratte, Maus
Grippotyphosa	Wühlmaus, Waschbär, Stinktier, Opossum

## 2.2. Übertragung

In einer experimentellen Studie wurde gezeigt, dass das Fressen von infizierten Nagern bei der Katze zur Infektion mit Leptospiren führt (SHOPHET &

MARSHALL, 1980). In Deutschland konnte kürzlich bei 9,7 % der Nager und Spitzmäuse (288 von 2.973 Nagern und Spitzmäusen) DNA pathogener Leptospiren (*L. kirschneri*, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*) nachgewiesen werden (*lipL32*-qPCR; Primer G1/G2 und B64-I/B64-II) (MAYER-SCHOLL et al., 2014). Auf Réunion Island (französische Insel im Indischen Ozean) wurde sogar bei 80 von 143 Nagern oder Spitzmäusen (55,9 %) DNA pathogener *Leptospira* species (spp.) in Nierenproben mittels *lipL32*-qPCR gefunden. In Frankreich wurden Nierenproben von 84 wildlebenden Ratten mittels PCR und Kultur auf Leptospiren untersucht (AYRAL et al., 2015). Siebenunddreißig Ratten hatten ein positives Kultur- oder PCR-Ergebnis (44,0 %) (AYRAL et al., 2015). Daher sind jagende Katzen besonders gefährdet, sich mit Leptospiren zu infizieren (DESVARS et al., 2013).

Leicht alkalischer Urin von Pflanzenfressern stellt ein gutes Milieu für Leptospiren dar. Pflanzenfresser können chronische Ausscheider von Leptospiren sein (Tabelle 5). Stallungen von Nutztieren stellen somit eine weitere Infektionsquelle dar (HARKNESS et al., 1970; EVERARD et al., 1985; TRUONG et al., 2013). Auch Hunde können chronische Ausscheider von Leptospiren sein (HARKIN et al., 2003; ROJAS et al., 2010; GAY et al., 2014; LLEWELLYN et al., 2015) (Tabelle 5). In unverdünntem, saurem Urin von fleischfressenden Tieren überleben Leptospiren jedoch nur für kurze Zeit. Dennoch kann ein enges Zusammenleben mit Hunden oder Katzen durch direkten Kontakt mit Urin zu einer Infektion führen (HARTMANN et al., 2013).

Stehende oder langsam fließende Gewässer sind insbesondere in den warmen Sommer- oder Herbstmonaten ein gutes Nährmedium für Leptospiren, denn die optimale Umgebungstemperatur für die Erreger liegt bei 28 °C bis 30 °C (LEVETT, 2001; GREENE et al., 2006; MUNOZ-ZANZI et al., 2014b). Da Katzen jedoch eine natürliche Abneigung gegen Wasser zeigen, wird die indirekte Übertragung über kontaminiertes Wasser bei der Katze als weniger wahrscheinlich angesehen (HARTMANN et al., 2013).

Die Rolle von Zecken bei der Übertragung von Leptospiren ist umstritten (BURGDORFER, 1956; KREPKOGORSKAIA & REMENTSOVA, 1957; BURGDORFER, 1959). WOJCIK-FATLA und Mitarbeiter konnten bei 10,5 % der untersuchten Zecken in Polen (88 von 836 Zecken; 95 % Konfidenzintervall [CI]: 8,4–12,6) DNA pathogener *Leptospira* spp. nachweisen (WOJCIK-FATLA

et al., 2012). Ob die Zecke letztendlich eine Rolle in der Übertragung spielt, ist jedoch nicht geklärt.

### **2.3. Geografische Verbreitung**

Die Leptospirose ist eine weltweit auftretende Erkrankung. Die Antarktis ist der einzige Kontinent, auf dem Leptospiren bislang nicht nachgewiesen wurden (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Leptospiren sind besonders in subtropischen bis tropischen Regionen verbreitet (LEVETT, 2001; VICTORIANO et al., 2009), denn sie bevorzugen ein warmes und feuchtes Klima. Doch auch in gemäßigten Zonen kommen Leptospiren vor (BROCKMANN et al., 2010; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2012; BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG & ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2014; HOENIGL et al., 2014). In Deutschland verbreiten sie sich bevorzugt in den warmen Sommer- und Herbstmonaten (JANSEN et al., 2005; GEISEN et al., 2007; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2012). Regenfälle und Überschwemmungen erhöhen die Überlebenschance von Leptospiren (BROCKMANN et al., 2010; WASINSKI & DUTKIEWICZ, 2013; CHAN et al., 2014).

Leptospiren sind vor allem in ländlichen Gegenden verbreitet (AZÓCAR-AEDO et al., 2014). In der Stadt sind sie aufgrund eines geringeren Vorkommens von Reservoirwirten (z. B. Nutztiere, Nagetiere) seltener (FAINE, 1981; BHARTI et al., 2003). Starke Regenfälle, Überschwemmungen und die Ausbreitung von Schädlingen (Mäuse, Ratten) erhöhen die Prävalenz von Leptospiren in der Stadt (BROCKMANN et al., 2010; MAYER-SCHOLL et al., 2014; MUNOZ-ZANZI et al., 2014a).

## **3. Prävalenz der feline Leptospirose**

### **3.1. Antikörperprävalenz bei der Katze**

Die Prävalenz von Leptospirenantikörpern bei natürlich infizierten Katzen von 4,8 % in den USA (MARKOVICH et al., 2012) bis 48,5 % in Frankreich (LUCIANI, 2004). Die Antikörperprävalenz wurde in allen Studien mittels MAT untersucht, wobei auf unterschiedliche Serovare getestet wurde. Der Testtrennwert wurde zum Teil unterschiedlich gewählt (Tabelle 1).

### 3.2. Leptospirurie bei der Katze

HARKNESS und Mitarbeiter berichteten bereits 1970 vom Nachweis von Leptospiren im Urin einer gesunden, natürlich infizierten Katze (HARKNESS et al., 1970). Nach einem Ausbruch von Leptospirose (Serovare Andaman und Medanensis) bei drei Bewohnern eines Bauernhofes in Neuseeland wurden im Zuge epidemiologischer Untersuchungen 25 Rinder, vier Hunde und eine Katze auf diesem Bauernhof untersucht. Bei der Katze konnten im Urin im Dunkelfeld Leptospiren nachgewiesen werden. Die Katze wies auch einen hohen Titer von 1:3.000 gegen das Serovar Pomona auf. Klinisch war sie unauffällig. Mittels Urinkultur und einer Anzucht aus Nierengewebe nach Tötung der Katze konnte das Serovar Pomona identifiziert werden. Die Katze wurde einige Monate zuvor auf den Bauernhof geholt und stammte von einem anderen Bauernhof. Mehrere Rinder auf diesem Bauernhof hatten nach einer Infektion mit dem Serovar Pomona abortiert. Es ist somit denkbar, dass die Katze über mehrere Monate Träger und Ausscheider des Serovars Pomona war (HARKNESS et al., 1970).

In einer Studie auf Réunion Island wurden Straßenkatzen *post mortem* Nierenproben entnommen und mittels qPCR (*lipL32*-PCR) untersucht. Bei sechs von 21 Katzen (28,6 %; 95 % CI: 9,3–47,9) konnte DNA pathogener *Leptospira* spp. amplifiziert werden (DESVARS et al., 2013).

Es gibt drei Studien zur Ausscheidung von DNA pathogener *Leptospira* spp. über den Urin bei natürlich infizierten Katzen. Die Prävalenz reicht von 3,4 % in Kanada (RODRIGUEZ et al., 2014) bis 67,8 % in Taiwan (CHAN et al., 2014) (Tabelle 2).

## 4. Pathogenese der felines Leptospirose

Es wird angenommen, dass die Pathogenese der felines Leptospirose der des Menschen und des Hundes entspricht (HARTMANN et al., 2013). Die Aufnahme von Leptospiren erfolgt über Hautwunden oder intakte Schleimhaut. Apathogene Leptospiren werden im Blut durch die unspezifische Immunabwehr abgetötet (FAINE, 1981). Pathogene Leptospiren hingegen zirkulieren bis zu sieben Tage im Blut. *Leptospira*-Toxine können dabei Endothelschäden verursachen (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Durchblutungsstörungen in verschiedenen Organsystemen (insbesondere Lunge, Leber und Nieren) können

entzündliche und degenerative Veränderungen in diesen hervorrufen (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). In der initialen Phase der Infektion binden die Leptospiren an Inhibitoren der Komplementaktivierung und entgehen so der Immunreaktion des Wirtes (BARBOSA et al., 2009). Nach etwa einer Woche bildet der Wirt Antikörper, welche die Leptospiren in der zweiten Phase der Infektion aus dem Blut und den meisten Organen entfernen (LEVETT, 2001; SCHULLER et al., 2015). In den Tubuluszellen der Niere können Leptospiren, geschützt vor der Immunantwort des Körpers, überleben und über den Urin ausgeschieden werden (FAINE, 1981; ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Leptospiren persistieren auch in Augen und Gelenken und können zu rezidivierenden Uveitiden und Polyarthritiden führen (SCHULLER et al., 2015).

#### **4.1. Organmanifestation**

Bei der Katze werden nach experimentellen und natürlichen Infektionen vorwiegend makroskopische und mikroskopische Läsionen von Leber und Niere beschrieben. Seltener wird von Veränderungen in anderen Organen (z. B. Lunge, Milz, Gehirn) berichtet.

Die Nieren von infizierten Katzen können eine unregelmäßige Oberfläche mit verhärteter Nierenrinde aufweisen, aufgehellte sein oder es können sich hellere Pünktchen bilden. Hämorrhagien und histopathologische Anzeichen einer nicht-eitrigen interstitiellen Nephritis sind beschrieben (FESSLER & MORTER, 1964; HARKNESS et al., 1970; ARBOUR et al., 2012). Leptospiren können mittels Dunkelfeldmikroskop im Tubuluslumen der Nieren erkannt werden (HARKNESS et al., 1970).

Die Leber von infizierten Katzen kann makroskopisch vergrößert sein. Histopathologisch weist sie häufig degenerative Veränderungen (Verfettung, Nekrosen) auf (FESSLER & MORTER, 1964; HARKNESS et al., 1970; BRYSON & ELLIS, 1976).

Leptospiren wurden außerdem bei infizierten Katzen in Milz, Lunge, Gehirn, Thoraxerguss und Kammerwasser nachgewiesen (HARKNESS et al., 1970; BRYSON & ELLIS, 1976). Hämorrhagien sind bei infizierten Katzen in diversen Organen (Nieren, Lunge, Gehirn) beschrieben (HARKNESS et al., 1970; BRYSON & ELLIS, 1976). Totgeburten treten ebenfalls auf, wenn sich trächtige Katzen mit Leptospiren infizieren (REILLY et al., 1994). Leptospiren wurden



außerdem bei infizierten Katzen in Milz, Lunge, Gehirn, Thoraxerguss und Kammerwasser nachgewiesen (HARKNESS et al., 1970; BRYSON & ELLIS, 1976).

Beim Hund und beim Menschen ist ein pulmonäres hämorrhagisches Syndrom der Leptospirose bekannt, welches lokal gehäuft auftritt und häufig letal ist (KLOPFLEISCH et al., 2010). Als Ursache werden *Leptospira*-Toxine, körpereigene Immunreaktionen oder disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) diskutiert (KLOPFLEISCH et al., 2010). Eine Studie berichtete auch über den Nachweis von Lungenhämorrhagien und Leptospiren in der Lunge bei der Katze (BRYSON & ELLIS, 1976).

#### **4.2. Krankheitsverlauf**

Werden Katzen experimentell mit Leptospiren infiziert, sind die Symptome meist mild (FESSLER & MORTER, 1964; SHOPHET & MARSHALL, 1980). Bislang gibt es nur einzelne Berichte zu natürlichen Krankheitsfällen bei der Katze (BRYSON & ELLIS, 1976; ARBOUR et al., 2012; BEAUDU-LANGE & LANGE, 2014).

##### **4.2.1. Experimentelle Infektionen**

SEMMELE infizierte 1954 sechs Katzen mit pathogenen Leptospiren (SEMMELE, 1954). Jeweils zwei Tiere wurden mit dem Serovar Icterohaemorrhagiae, Canicola und Grippotyphosa infiziert. Eine nicht-infizierte Katze wurde als Kontrolltier in die Studie eingeschlossen. Die Körpertemperatur der Katzen wurde zwei Tage vor Infektion bis 14 Tage *post infectionem* (*p. i.*) täglich kontrolliert, und das Allgemeinbefinden wurde überwacht. Zwei bis fünf Tage vor Infektion und zwei, 14, 28 und 42 Tage *p. i.* wurde das Blutbild kontrolliert und ein MAT durchgeführt. Vier Tage *p. i.* wurde eine Blutkultur zum Nachweis von Leptospiren angelegt. Der Nachweis von Leptospiren in der Blutkultur war nur bei einer Katze positiv. Der isolierte Stamm (Serovar Canicola) war dabei mit dem Stamm identisch, der für die Infektion verwendet wurde. Das Allgemeinbefinden der sechs infizierten Katzen und des Kontrolltieres blieb während der gesamten Zeit des Versuches (acht Wochen) ungestört. Fünf der infizierten Katzen entwickelten leichten Durchfall. Drei Tiere zeigten eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur (bis zu 39,5 °C). Labordiagnostisch hatten alle Katzen eine leichte Leukozytose. Die infizierten Katzen zeigten *p. i.* einen

Titeranstieg mit maximalen Titerwerten von  $\geq 1:3.200$  zwei bis vier Wochen nach Infektion. Sechs Wochen *p. i.* waren noch vier Katzen positiv im MAT, acht Wochen *p. i.* zeigte keine Katze einen Titer im MAT (niedrigste Verdünnungsstufe 1:10). Das Kontrolltier war stets negativ im MAT. Nach Beendigung des Versuches wurden dem Kontrolltier im Rahmen eines zweiten Versuches Innereien (Niere, Leber, Milz) von zwei infizierten Mäusen gefüttert. Beide Mäuse waren am Tag zuvor mit dem Sero var Sejroe infiziert worden. Das Allgemeinbefinden der Katze blieb nach Aufnahme der Innereien ungestört. Die Ergebnisse einer Blutkultur (zwei Tage *p. i.*) und mehrerer MAT-Untersuchungen (vor Infektion sowie zwei und vier Wochen *p. i.*) waren negativ (SEMMELE, 1954).

FESSLER und MORTER infizierten sechs Katzen mit dem Sero var Pomona und weitere sechs Katzen mit dem Sero var Ballum (FESSLER & MORTER, 1964). Die Tiere wurden bis zu zwei Monate nach experimenteller Infektion regelmäßig untersucht. Eine der zwölf infizierten Katzen zeigte ab Tag 40 *p. i.* Polyurie (PU) und Polydipsie (PD). Bei den restlichen Katzen konnten keine klinischen Auffälligkeiten festgestellt werden. Regelmäßige Blutbildkontrollen waren bei allen Katzen unauffällig. Alle Katzen entwickelten ab Tag drei *p. i.* Antikörper. Außerdem konnten Leptospiren aus Blut (bei drei Katzen), Urin (bei sechs Katzen) und Nierengewebe (bei zwei Katzen) isoliert werden. Zwei Katzen zeigten eine Leptospirurie, eine für zwei und eine für acht Wochen nach Infektion. In der pathologischen Untersuchung hatten fünf Tiere eine vergrößerte Leber. Histopathologisch wurden bei vier Katzen in der Leber degenerative Veränderungen festgestellt. Bei einer Katze waren die Nieren makroskopisch verändert. Die Nierenkapsel war weißlich gefleckt und die Nierenrinde höckerig. Fünf Katzen zeigten eine nicht-eitrige interstitielle Nephritis (FESSLER & MORTER, 1964).

SHOPHET und MARSHALL verfütterten mit Leptospiren (Sero var Ballum) infizierte Mäuse und einzelne Innereien dieser Mäuse an Katzen (SHOPHET & MARSHALL, 1980). Bis auf eine Erhöhung der Körpertemperatur zu Beginn der Leptospirurie bei einer Katze zeigte keine Katze klinische Symptome. Alle Versuchstiere hatten einen MAT-Titer zwei Wochen nach Infektion. Eine Leptospirurie konnte bei allen mit infizierten Mäusen gefütterten Katzen und bei einer mit infizierten Innereien gefütterten Katze zwölf bis 15 Tage *p. i.*

nachgewiesen werden (SHOPHET & MARSHALL, 1980).

Wenige Jahre später wurden in einer experimentellen Studie fünf Katzen mit dem Serovar Icterohaemorrhagiae und weitere fünf Katzen mit dem Serovar Canicola infiziert (LARSSON et al., 1985). Keine Katze zeigte klinische Symptome oder labordiagnostische Veränderungen. Eine Woche *p. i.* hatten neun Katzen Antikörper gegen Leptospiren, die bis zur achten bis zwölften Woche *p. i.* nachweisbar waren. Eine Leptospirurie wurde nur bei Katzen nachgewiesen, die mit dem Serovar Canicola infiziert waren und nicht bei denen, die mit dem Serovar Icterohaemorrhagiae infiziert waren. Eine Leptospirurie konnte zwei bis vier Wochen *p. i.* über einen Zeitraum von zwei bis acht Wochen nachgewiesen werden. Bei keiner Katze konnten Leptospiren aus Nierengewebe oder Blut isoliert werden (LARSSON et al., 1985).

#### **4.2.2. Natürliche Infektionen**

##### **4.2.2.1. Fallberichte**

ARBOUR und Mitarbeiter berichteten über drei Katzen mit klinisch manifester Leptospirose in Kanada. Alle drei Katzen waren Freiläufer und bekannte Jäger und zeigten seit Kurzem PU/PD (ARBOUR et al., 2012).

Die erste Katze, eine 18 Monate alte, männlich kastrierte Europäische Kurzhaarkatze (EKH), wurde wenige Monate zuvor aus einem Tierheim geholt. Dort hatte sie Freigang und konnte jagen. Die Katze wurde beim Tierarzt vorgestellt, da sie seit zwei Wochen PU/PD zeigte. Bis auf ein erniedrigtes urinspezifisches Gewicht (USG) von 1,005 waren alle Blut- und Urinuntersuchungen unauffällig. Wenige Tage nach dem Tierarztbesuch wurde die Katze apathisch und anorektisch. Sie wurde in einer Tierklinik vorgestellt. Eine erhöhte Körpertemperatur (39,5 °C) und eine Dehydratation (5–6 %) waren auffällig. Labordiagnostisch hatte die Katze eine hochgradige Neutrophilie ( $34,9 \times 10^9/l$  Referenzbereich,  $2,5\text{--}12,5 \times 10^9/l$ ) mit Linksverschiebung (stabkernige Neutrophile:  $1,5 \times 10^9/l$ ; Referenzbereich,  $0,0\text{--}0,3 \times 10^9/l$ ) und einen hyposthenurischen Urin (1,007). Im Ultraschall war die Abgrenzung zwischen Nierenrinde und Nierenmark unklar. Aufgrund der anhaltenden erhöhten Körpertemperatur und der Neutrophilie mit Linksverschiebung wurde die Katze mit Ampicillin und Enrofloxacin behandelt. Außerdem wurde sie infundiert und bekam ein Appetitstimulanz und Vitamin B. Der eingeleitete MAT zeigte einen

Titer von 1:12.800 gegen das Serovar Pomona und einen Titer von jeweils 1:200 gegen die Serovare Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae und Hardjo. An Tag 5 des stationären Aufenthaltes normalisierte sich der Urinabsatz und das Trinkverhalten. An Tag 6 konnte die Katze mit Amoxicillin-Clavulansäure für zwei Wochen und Doxycyclin im Anschluss über vier Wochen entlassen werden. Bei der Kontrolle (zwei Wochen nach Entlassung) war die Katze klinisch unauffällig. Jeweils ein und acht Monate nach Diagnosestellung wurde ein Abdomenultraschall wiederholt. Es konnten keine Veränderungen der Nieren mehr festgestellt werden. Eine Blutuntersuchung ein Jahr später war ebenfalls unauffällig. Anhand des hohen Titers, der Symptome und des Ansprechens auf Antibiose wurde bei der Katze eine klinisch manifeste Leptospirose diagnostiziert.

Die zweite Katze, eine neunjährige, männlich kastrierte EKH, zeigte PU/PD über einen Zeitraum von zehn Tagen und intermittierende Hämaturie. Außerdem hatte die Katze seit zwei Monaten eine Uveitis des rechten Auges, welche mit antibiotischen Augensalben und Dexamethason-haltigen Augentropfen behandelt wurde. Des Weiteren lahnte die Katze seit drei Wochen leicht im Bereich der rechten Vordergliedmaße. Die Katze hatte zum Zeitpunkt der Vorstellung seit fast einem halben Jahr keinen Freigang mehr, jagte jedoch noch Nager im Haus. Labordiagnostisch konnte eine Azotämie mit einem Harnstoff von 14,6 mmol/l (Referenzbereich: 3,6–10,7 mmol/l) und einem Kreatinin von 169 µmol/l (Referenzbereich: 0–175 µmol/l) festgestellt werden. Das USG lag bei 1,036. Außerdem waren im Urin moderate Mengen von Erythrozyten, Lipiden und Zylinder. Die Katze zeigte eine Proteinurie von 0,3 g/l. Im Abdomenultraschall stellte sich die linke Niere klein und unregelmäßig dar und wies eine höckerige Oberfläche auf. Die rechte Niere hingegen war vergrößert und hatte eine schmale Nierenrinde. Röntgenuntersuchungen der rechten Vordergliedmaße waren unauffällig. Ein MAT wurde eingeleitet und es wurden Titer von jeweils 1:1.600 gegen die Serovare Pomona und Bratislava und ein Titer von 1:800 gegen das Serovar Grippotyphosa festgestellt. Die Katze wurde für drei Wochen mit Amoxicillin-Clavulansäure behandelt. Nach 30 Tagen verschwanden PU/PD, Lahmheit und Uveitis. Für weitere zehn Wochen wurde Doxycyclin verabreicht. Zwei Monate nach Erstvorstellung waren die Nierenwerte wieder im Referenzbereich. Die Katze entwickelte drei Jahre später erneut eine intermittierende Uveitis des rechten Auges. Die Diagnose klinisch manifeste

Leptospirose wurde gestellt wegen der hohen Titer, der Symptome und des Ansprechens auf Antibiose.

Der dritte feline Leptospirosefall war eine dreijährige, weiblich kastrierte EKH, die wegen Anorexie und Apathie seit wenigen Tagen vorstellig wurde. Bereits wenige Monate zuvor hatte die Katze langsam an Gewicht verloren und PU/PD gezeigt. Die Katze war Freigänger und Jäger. Sie war hochgradig azotämisch (renal) mit einem Harnstoff von 94 mmol/l (Referenzbereich: 5–13 mmol/l) und einem Kreatinin von 2.093  $\mu$ mol/l (Referenzbereich: 50–177  $\mu$ mol/l). Phosphat war erhöht mit 4,4 mmol/l (Referenzbereich: 0,8–2,5 mmol/l). Außerdem hatte die Katze eine geringgradige Neutrophilie ( $13,8 \times 10^9/l$ ; Referenzbereich:  $2,5\text{--}12,5 \times 10^9/l$ ), Lymphopenie ( $0,7 \times 10^9/l$ ; Referenzbereich:  $1,5\text{--}7,0 \times 10^9/l$ ) und eine moderate Thrombozytopenie ( $72 \times 10^9/l$ ; Referenzbereich:  $120\text{--}600 \times 10^9/l$ ). Röntgenologisch stellten sich die Nieren beidseits vergrößert und unregelmäßig dar, und die Katze hatte Aszites. Sie wurde infundiert und mit Enrofloxacin und Cefazolin behandelt. Am zweiten Tag entwickelte die Katze Dyspnoe und erhöhte Körpertemperatur (39,8 °C). Die Nierenwerte waren unverändert hoch, die Neutrophilie wurde ausgeprägter ( $38,6 \times 10^9/l$ ; Referenzbereich:  $2,5\text{--}12,5 \times 10^9/l$ ). Zudem bekam die Katze Anfälle. Aufgrund der Verschlechterung der Symptome wurde sie in eine Klinik überwiesen. Dort war die Katze in Seitenlage und zeigte eine bilaterale, teilweise lichtresponsive Mydriasis. Außerdem wurden beidseits vergrößerte Nieren, Ulzera im Maul und auf der Hornhaut und Muskelzuckungen befundet. Im Ultraschall dominierten vergrößerte, deformierte Nieren. Zudem waren Magenwand und Duodenum verdickt und verändert. Wenig Aszites war vorhanden. Eine Feinnadelaspiration der Nieren wurde durchgeführt. Die zytologische Untersuchung ergab eine eitrige Entzündung. Der Aszites wurde punktiert. Es wurde ein modifiziertes Transsudat nachgewiesen. Eine PCR auf Leptospiren und ein MAT wurden eingeleitet. Trotz intensiver Betreuung verschlechterte sich der Zustand der Katze. Sie zeigte phasenweise Dyspnoe und Anfälle und entwickelte Ödeme und Ekchymosen. Die Urinproduktion nahm ab und konnte trotz Furosemidgabe nicht aufrecht erhalten werden. Trotz Peritonealdialyse verschlechterte sich das Allgemeinbefinden, sodass die Katze euthanasiert wurde. In der Sektion wurden ein Hydrothorax, ein Hydroperikard und ein Lungenödem festgestellt. In den Nieren wurden interstitielle Fibrosen und lymphozytäre Infiltrationen nachgewiesen, welche auf

eine tubulointerstitielle Nephritis hinwiesen. Eine PCR aus Nieren- und Urinproben wies Leptospiren-DNA nach. Im MAT wurden Titer von jeweils 1:3.200 gegen die Serovare Pomona und Icterohaemorrhagiae, Titer von jeweils 1:1.600 gegen die Serovare Bratislava und Autumnalis und einen Titer von 1:100 gegen das Serovar Grippotyphosa nachgewiesen (ARBOUR et al., 2012). Die Diagnose klinisch manifeste Leptospirose wurde in diesem Fall aufgrund des Nachweises von Leptospiren-DNA im veränderten Nierengewebe und Urin und aufgrund der hohen MAT-Titer gestellt.

Ein weiterer Fallbericht wurde von BEAUDU-LANGE und LANGE publiziert (BEAUDU-LANGE & LANGE, 2014). Eine vier Jahre alte, weiblich kastrierte EKH wurde vorstellig, da sie seit ein paar Tagen gastrointestinale Symptome zeigte. Die Katze lebte in einem Haushalt mit mehreren Hunden, welche gerne jagten. Bei Vorstellung zeigte die Katze hyperästhetische Reaktionen und Schmerzen beim Handling. Die Haut an den Ohren, den Pfoten und am Bauch war entzündlich verändert und hatte Läsionen. Im Labor war eine Proteinurie, eine Hyperglobulinämie und eine prärenale Azotämie auffällig. Im Abdomenultraschall wurden vergrößerte Nieren und ein verändertes Pankreasgewebe befundet. Im Blut wies eine PCR Leptospiren-DNA nach. Eine Behandlung erfolgte mit Cefovecin und Methylprednisolon für fünf Tage. Zwei Wochen später wurde die Katze für vier Wochen mit Doxycyclin behandelt. In zwei MAT-Untersuchungen wurden Antikörper gegen das Serovar Saxkoebing nachgewiesen (BEAUDU-LANGE & LANGE, 2014). Die Diagnose klinisch manifeste Leptospirose wurde aufgrund der positiven Blut-PCR gestellt.

BRYSON und ELLIS berichteten über eine weibliche EKH (geschätztes Alter: zwölf bis 18 Monate) mit Leptospirose (BRYSON & ELLIS, 1976). Die Katze war verwildert und lebte in der Nähe eines Bauernhofes. Sie wurde tot aufgefunden. In der Pathologie waren Petechien (an Konjunktiven, Skleren, Meningen), Thorax- und Abdominalerguss auffällig. Leber und Milz waren leicht vergrößert. Die Nieren waren makroskopisch ohne Befund. Histopathologisch konnten Lebernekrosen sowie Gefäßläsionen und Hämorrhagien in Lunge und Gehirn nachgewiesen werden. Eine leichte bis moderate Tubulusdegeneration in der Niere war auffällig. Durch Silberimprägnierung konnten Leptospiren in Lunge, Gehirn und Niere dargestellt werden. Mittels Dunkelfeldmikroskopie wurden Leptospiren auch im Thoraxerguss gefunden. Die Erreger konnten aus

Thoraxerguss, Kammerwasser und Nieren isoliert werden. Eine Serotypisierung gelang nicht, da die Kulturen keine ausreichende Dichte an Leptospiren aufwiesen. Mit dem Antiserum Bratislava konnte jedoch eine starke Fluoreszenz in Lunge, Leber, Niere und Gehirn erzeugt werden. Die Antiseren Canicola, Icterohaemorrhagiae und Ballum erzeugten hingegen nur eine schwache Fluoreszenz und das Antiserum Hardjo erzeugte keine Fluoreszenz (BRYSON & ELLIS, 1976). Die Diagnose wurde aufgrund des Nachweises der Leptospiren im Gewebe gestellt.

AGUNLOYE & NASH berichteten von acht Katzen mit Antikörpern gegen Leptospiren (AGUNLOYE & NASH, 1996). Alle Katzen hatten verminderten Appetit, sieben waren lethargisch und zeigten Gewichtsverlust. PU/PD war bei vier Tieren auffällig. Drei Tiere zeigten Erbrechen, zwei hatten Aszites und eine Katze hatte eine palpatorisch vergrößerte Leber. Vier Katzen waren azotämisch und sechs Katzen hatten erhöhte Leberenzyme. Ob die Infektion mit Leptospiren ursächlich für die klinischen Erscheinungen und die Laborveränderungen war, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (AGUNLOYE & NASH, 1996).

MILLAN und Mitarbeiter berichteten von sechs Streunerkatzen aus Andalusien, die histopathologisch untersucht wurden und bei denen eine Leptospiroseinfektion durch direkten Nachweis oder mittels Serologie festgestellt werden konnte (MILLAN et al., 2009). Katze 1 zeigte in der histopathologischen Untersuchung eine chronisch interstitielle Nephritis und eine chronische entzündliche Infiltration mit der Präsenz von Makrophagen und Lymphozyten. Auch die Leber wies chronisch entzündliche Veränderungen auf. Das Serovar Icterohaemorrhagiae wurde festgestellt (direkter Nachweis: Kultur, Silberimprägnierung, Immunfluoreszenz). Katze 2 wies ebenfalls eine chronisch interstitielle Nephritis mit chronisch entzündlicher Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen auf. Außerdem konnte eine proliferative Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Die Leber war multifokal nekrotisch verändert und mit Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert. Ein Titer von 1:2.000 gegen das Serovar Icterohaemorrhagiae wurde mittels MAT festgestellt. Katze 3 war histopathologisch ohne Befund. Dennoch konnte das Serovar Canicola nachgewiesen werden (direkte Detektion: Kultur, Silberimprägnierung, Immunfluoreszenz). Bei Katze 4 war wiederum eine chronische interstitielle Nephritis mit chronischer entzündlicher Infiltration von Makrophagen und

Plasmazellen auffällig. Ein MAT-Titer  $< 1:100$  gegen das Serovar Ballum war nachweisbar. Katze 5 war histopathologisch unauffällig, zeigte jedoch einen Titer von  $1:400$  gegen das Serovar Ballum. Bei Katze 6 wurde histopathologisch eine chronisch interstitielle Nephritis mit infiltrierten Makrophagen und Lymphozyten diagnostiziert. Ein MAT-Titer  $< 1:100$  gegen das Serovar Icterohaemorrhagiae war auffällig. Offen bleibt, ob die Leptospiroseinfektion ursächlich für die histopathologischen Veränderungen war (MILLAN et al., 2009).

#### **4.2.2.2. Zusammenhang zwischen Infektionen und Symptomen**

Zwei Studien berichteten von einem Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Antikörpern und Nierenerkrankungen (LUCIANI, 2004; RODRIGUEZ et al., 2014). Während 14 von 16 Katzen mit PU/PD (87,5 %) Antikörper gegen Leptospiren hatten, waren nur 32 von 80 gesunden Katzen (40,0 %) im MAT positiv (LUCIANI, 2004). Während 17 von 114 nierenkranken Katzen (14,9 %; 95 % CI: 8,3–21,6) Leptospiren-Antikörper hatten, waren nur neun von 125 gesunden Katzen (7,2 %; 95 % CI: 2,2–12,2) im MAT positiv. Eine andere Studie hingegen fand keinen Zusammenhang zwischen chronischen Nierenerkrankungen (CNE) bei der Katze und dem Vorhandensein von Antikörpern gegen Leptospiren (SHROPSHIRE et al., 2015). Während vier von 66 azotämischen Katzen Antikörper hatten (6,1 %), waren acht von 75 Katzen ohne Azotämie (10,7 %) im MAT positiv (SHROPSHIRE et al., 2015). Auch der Zusammenhang Leptospirurie und CNE erreichte in der Studie aus Kanada keine statistische Signifikanz. Zwei von 125 klinisch gesunden Katzen und sechs von 113 Katzen mit CNE waren PCR-positiv (RODRIGUEZ et al., 2014).

## **5. Diagnose einer Infektion mit Leptospiren bei der Katze**

Viele Katzen scheinen mit Leptospiren infiziert zu sein, aber nicht zu erkranken (CHAN et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2014). Die Diagnose feline Leptospirose kann nur gestellt werden, wenn die Katze entsprechende Symptome (siehe 4.2. Krankheitsverlauf) zeigt.

### **5.1. Direkter Erregernachweis**

Direkte Erregernachweise (insbesondere aus Urinproben) sind bei der Katze zur Beurteilung der Zoonosegefahr wichtig. Am häufigsten wird die PCR (aus Urin) durchgeführt.



### **5.1.1. Mikroskopischer Erregernachweis**

Leptospiren können in frisch entnommenen Urinproben mittels Dunkelfeldmikroskop entdeckt werden. Dabei ist eine 200- bis 250-fache Vergrößerung notwendig. Die Urinproben können zentrifugiert werden (15.000 x g, eine Stunde), falls Fremdpartikel stören (NEUMEISTER et al., 2009). Neben Urin kann für den mikroskopischen Erregernachweis auch Blut, Zerebrospinal-, Peritoneal- oder Pleuraflüssigkeit verwendet werden (LEVETT, 2001). Blut ist nur während der akuten Phase mit Leptospiämie geeignet. Fibrin- oder Proteinfäden können allerdings Brown'sche Bewegung zeigen und dadurch leicht mit Spirochäten verwechselt werden (Pseudospirochäten) (LEVETT, 2001; NEUMEISTER et al., 2009). Blut-, Peritoneal- oder Pleuraflüssigkeit werden vor der Untersuchung mit Antikoagulanzen versetzt und zentrifugiert (500 x g, zehn Minuten), um zelluläre Bestandteile zu entfernen (NEUMEISTER et al., 2009). Zerebrospinalflüssigkeit enthält zumeist nur wenig Leptospiren (LEVETT, 2001). Falls dennoch Liquor cerebrospinalis untersucht werden soll, sollte er nativ untersucht werden. In Gewebeschnitten oder luftgetrockneten Ausstrichen können Leptospiren nach Giemsa-Färbung oder Silberimprägnierung (Warthin-Starry-Färbung) mittels Lichtmikroskop betrachtet werden (LEVETT, 2001; HARTMANN & HEIN, 2008). Eine weitere Möglichkeit zur Sichtbarmachung im Gewebe stellt die Immunfluoreszenzfärbung dar (LEVETT, 2001).

### **5.1.2. Kultureller Nachweis**

Der kulturelle Nachweis von Leptospiren kann Wochen bis Monate dauern (LEVETT, 2001). Nichtsdestotrotz kann eine Kultur sinnvoll sein, da sie die Lebensfähigkeit der Leptospiren beweisen kann. Das zu untersuchende Probenmaterial (Urin-, Liquor- oder Blutproben) muss nach Entnahme schnellstmöglich in Transportmedien überführt werden. Dabei werden zwischen 0,1 und 2 ml des Probenmaterials auf 5 ml bis 15 ml des Leptospirennährmediums getropft (FAINE, 1981; NEUMEISTER et al., 2009). Als Leptospirenmedium werden das Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris-Medium (EMJH-Medium) oder ähnliche Medien mit langkettigen Fettsäuren und Albumin empfohlen (FAINE, 1981). Die Bebrütung erfolgt bei circa (ca.) 30 °C (aerob bis mikroaerophil). Das Wachstum der Leptospiren dauert von fünf Tagen bis zu drei Monaten und sollte regelmäßig mittels Dunkelfeldmikroskopie kontrolliert werden (FAINE, 1981).

### 5.1.3. Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist für die Leptospirediagnostik von großer Bedeutung. Sie ermöglicht eine Diagnose bereits in der ersten Woche der Erkrankung (MERIEN et al., 1995; SYKES et al., 2011). Man unterscheidet konventionelle Techniken und moderne Echtzeit-Verfahren (NEUMEISTER et al., 2009). Zumeist wird Blut (Vollblut oder Serum) oder Urin als Probenmaterial für eine PCR in der Leptospirediagnostik verwendet. Es können aber auch Gewebeproben (Niere), Kammerwasser, Zerebrospinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit oder Vaginalflüssigkeit verwendet werden (GREENE et al., 2006).

#### 5.1.3.1. Primerwahl

In der Leptospirediagnostik sollen die Primer für eine PCR ausschließlich auf Genabschnitte passen, welche bei pathogenen *Leptospira* spp. vorkommen und nicht bei Saprophyten (SYKES et al., 2011). *LipL32* kodiert z. B. das Oberflächenantigen pathogener Leptospiren (STODDARD et al., 2009). Ebenfalls spezifisch für pathogene *Leptospira*-Spezies, mit Ausnahme von *L. kirschneri*, sind die Primer G1 und G2. Diese stammen vom Genabschnitt des rekombinanten Plasmids *pLIPs60* (GRAVEKAMP et al., 1993). Die pathogene Genospezies *L. kirschneri* kann durch Amplifikation der Nukleotidsequenz der zwei Plasmide *pBIM12* und *pBIM64* nachgewiesen werden (Primer B64-I und B64-II) (GRAVEKAMP et al., 1993; BAL et al., 1994). Auch PCR-Protokolle, welche eine Amplifikation von Genabschnitten der 16S-rRNA und 23S-rRNA Gene vorsehen, können zwischen pathogenen und saprophytischen Leptospiren differenzieren (WOO et al., 1997; SMYTHE et al., 2002; BACKSTEDT et al., 2015).

#### 5.1.3.2. Sensitivität und Spezifität

FINK und Mitarbeiter konnten mittels qPCR (*lipL32*, 16S-rRNA)  $1,2 \times 10^2$  Leptospiren/ml nachweisen und mittels konventioneller PCR (Primer: B64-I/B64-II und G1/G2)  $1,2 \times 10^4$  Leptospiren/ml (FINK et al., 2015). Damit ist die qPCR ca. 100-fach sensitiver als die konventionelle PCR. Die Sensitivität von qPCRs liegt je nach Studie zwischen 43 % und 100 % (Tabelle 6). Falsch negative Ergebnisse kommen vor, wenn keine Leptospirämie oder -urie vorhanden ist (WEINGART & KOHN, 2012). Ein weiterer Grund für falsch negative Ergebnisse können PCR-Inhibitoren sein. PCR-Inhibitoren sind natürlicherweise

in den zu untersuchenden Proben vorhanden und werden aufgrund einer DNA-ähnlichen Löslichkeit durch die DNA-Extraktion nicht vollständig entfernt (GRAVEKAMP et al., 1993). Hemmstoffe können beispielsweise Gallesalze im Kot, Häm im Blut und Harnstoff im Urin sein. Außerdem können Komponenten von Blutröhrchen (Heparin) oder Konservierungsstoffe (Formalin) die PCR inhibieren (BUCKWALTER et al., 2014). Drei Studien untersuchten die Häufigkeit der PCR-Inhibition für Urinproben, welche auf *Chlamydia trachomatis* getestet wurden (CHONG et al., 1996.; MAHONY et al., 1998; TOYE et al., 1998). In einer Studie wurden 200 Urinproben mittels PCR auf *Chlamydia trachomatis* getestet. Dabei hatten 9 % der untersuchten Männer und 18 % der untersuchten Frauen Hemmstoffe im Urin (CHONG et al., 1996.). Bei 4,9 % der 388 untersuchten Urinproben von schwangeren und nicht-schwangeren Frauen wurde die PCR inhibiert (MAHONY et al., 1998). In der anderen Studie wurden zwei von 175 (1,1 %) Urinproben bei der Untersuchung mittels PCR gehemmt (TOYE et al., 1998). BUCKWALTER und Kollegen untersuchten insgesamt 386.706 Urinproben retrospektiv auf eine mögliche PCR-Inhibition. Die durchschnittliche Inhibitionsrate lag dabei bei 0,9 %. Paraffin-eingebettete Gewebe hatten dabei die höchste Inhibitionsrate mit 6,7 %, Urin die zweithöchste mit 1,1 %. Vollblut wies eine Inhibitionsrate von 1,0 % auf (BUCKWALTER et al., 2014).

Die Spezifität der PCR in der Leptospirosediagnostik beträgt je nach Protokoll zwischen 87 % (16S-rRNA-PCR bei Untersuchung von Urinproben) (FINK et al., 2015) und 100 % (*lipL32*-PCR) (AHMED et al., 2009; STODDARD et al., 2009; THAIPADUNPANIT et al., 2011; VILLUMSEN et al., 2012) (Tabelle 6). Falsch positive Ergebnisse können durch Kontaminationen vorkommen (GEISEN, 2009). Falsch positive Ergebnisse entstehen außerdem bei Verwendung ungeeigneter Primer. So erhielten STODDARD und Mitarbeiter und CHAN und Mitarbeiter falsch positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindung und Amplifikation fremder DNA-Sequenzen bei Verwendung eines Protokolls, welches auf dem 16S-rRNA-Genabschnitt basierte (STODDARD et al., 2009; CHAN et al., 2014). VILLUMSEN et al. erreichten mit der 16S-rRNA-PCR bei der Untersuchung von Urinproben aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien nur eine Spezifität von 92 % (VILLUMSEN et al., 2012). FINK und Mitarbeiter zeigten, dass die 16S-rRNA-PCR bei Verwendung von Spontanurin Umweltkeime

detektieren kann. In dieser Studie waren 13 % der aufgefangenen Urinproben falsch-positiv (FINK et al., 2015).

**Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität verschiedener Polymerasekettenreaktion-Verfahren**

PCR	Gen	Material	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Goldstandard (Vergleichstest)	Autoren
qPCR	<i>secY</i>	Blut	100	93	Kultur	AHMED et al., 2009
qPCR	<i>secY</i>	Blut	89	100	Kultur und Serologie (MAT und IgM-ELISA)	
qPCR	<i>lipL32</i>	Blut, Urin	100	100	Sequenzierung	STODDARD et al., 2009
qPCR	16S-rRNA	Blut	56	90	MAT und Kultur	THAIPADUNPANIT et al., 2011
qPCR	<i>lipL32</i>	Blut	43	93	MAT und Kultur	
qPCR	<i>lipL32</i>	Blut	86	100	MAT, Sequenzierung	VILLUMSEN et al., 2012
qPCR	16S-rRNA	Blut	100	97	MAT, Sequenzierung	
qPCR	<i>lipL32</i>	Urin	100	100	MAT, Sequenzierung	
qPCR	16S-rRNA	Urin	100	92	MAT, Sequenzierung	
qPCR	16S-rRNA	aseptisch gewonnener Urin	100	100	<i>lipL32</i> -PCR	FINK et al., 2015
qPCR	16S-rRNA	aufgefangener Urin	100	87	<i>lipL32</i> -PCR	
qPCR	<i>lipL32</i>	Urin	100	100	16S-rRNA-PCR	

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunabsorptionstest); IgM, Immunglobulin M; lip, Lipoprotein; MAT, Mikroagglutinationstest; qPCR, quantitative real-time PCR (quantitative Echtzeit-PCR); rRNA, ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)

## 5.2. Indirekte Nachweismethoden: Mikroagglutinationstest

Indirekte Nachweismethoden weisen Antikörper gegen Leptospiren nach. In der Regel sind drei bis zehn Tage nach Auftreten der ersten Symptome Antikörper vorhanden (MERIEN et al., 1995; LEVETT, 2001; SYKES et al., 2011). Studien, welche Antikörper gegen Leptospiren bei der Katze untersuchten, verwendeten ausschließlich den Goldstandard des Antikörpernachweises, den MAT.

Der MAT wurde nur drei Jahre nach Entdeckung der Ätiologie der Weil'schen Krankheit von MARTIN und PETTIT eingeführt (MARTIN & PETTIT, 1918). Bei diesem Test wird Patientenserum mit Kulturen verschiedener *Leptospira*-Serovare versetzt. Neben lebenden Leptospiren-Kulturen können auch mit Formalin abgetötete Antigene eingesetzt werden. Der Vorteil dabei ist, dass das

Laborpersonal weniger Gefahren ausgesetzt ist. Auch bei Verwendung von mit Formalin abgetöteten Antigenen müssen zunächst Leptospiren kultiviert werden. Nachteil der Tests mit abgetöteten Leptospiren ist, dass die nachgewiesenen Antikörper-Titer oft niedriger sind und Kreuzreaktionen häufiger sind, wie wenn der Test mit lebenden Leptospiren durchgeführt wird (LEVETT, 2001).

Leptospiren stellen hohe Anforderungen an die Kultivierung. Deshalb wird der MAT nur von spezialisierten Laboren durchgeführt. Eine Standardisierung gibt es dabei nicht. Normalerweise werden beim MAT gleiche Volumina einer Leptospirenkultur und Serumverdünnungen zusammengebracht. Dabei sollte eine vier- bis 14-tägige flüssige Kultur verwendet werden, welche zunächst bei 30 °C bis 32 °C inkubiert wird. Die Konzentration sollte  $1-2 \times 10^8$  Leptospiren/ml betragen. Die Agglutination erfolgt in einem Zeitraum von maximal vier Stunden bei Zimmertemperatur. Der MAT wird mithilfe der Dunkelfeldmikroskopie ausgewertet. Der Endpunkt ist die höchste Verdünnung, bei der noch 50 % Agglutination vorhanden ist (LEVETT, 2001).

Der MAT ist serogruppenspezifisch. Einzelne Serovare können nicht mittels MAT unterschieden werden (LEVETT, 2001). Aufgrund von Kreuzreaktionen kann nicht auf die ursächliche Serogruppe geschlossen werden. In einer Studie beim Menschen war in nur 46 % der Fälle die Serogruppe mit dem höchsten Titer ursächlich für die Infektion (LEVETT, 2003). Außerdem können unterschiedliche Labore bei der Untersuchung von ein- und derselben Probe unterschiedliche Ergebnisse erzielen (MILLER et al., 2011). Kreuzkontaminationen von Kulturen der zu untersuchenden Serovare sind eine mögliche Ursache hierfür. Außerdem ist die Auswertung der Agglutinationsreaktion sehr subjektiv (SYKES et al., 2011).

Der MAT kann nicht zwischen Impfantikörpern und natürlichen Antikörpern unterscheiden (BARR et al., 2005; MARTIN et al., 2014). Geimpfte Hunde können Antikörper-Titer von über 1:6.400 gegen Impfserovare und auch gegen andere Serovare aufweisen (MARTIN et al., 2014). So konnten 12 Wochen nach der letzten Impfung noch Titer  $\geq 1:1.600$  nachgewiesen werden (MARTIN et al., 2014). Niedrige Titer von 1:100 bis 1:400 waren sogar 49 Wochen nach der letzten Impfung noch nachweisbar (MARTIN et al., 2014).

Es gibt keine Leptospirose-Impfung für die Katze. Damit erschweren Impfantikörper nicht die Interpretation von vorhandenen MAT-Titern. Ein

weiteres Problem des MAT ist, dass die gewählten Testtrennwerte häufig unterschiedlich sind. Viele Autoren wählten bei der Katze einen Testtrennwert von 1:100 (MILLAN et al., 2009; MARKOVICH et al., 2012). MYLONAKIS und seine Mitarbeiter wählten einen Testtrennwert von 1:50 (MYLONAKIS et al., 2005), AGUNLOYE & NASH von 1:30 (AGUNLOYE & NASH, 1996) und SHOPHET zählte sogar einen Antikörper-Titer von 1:24 als positiv (SHOPHET, 1979) (Tabelle 1). Dies erschwert die Vergleichbarkeit von Studien und Laborergebnissen.

Die Häufigkeit bestimmter Serogruppen kann je nach geografischer Lage variieren. Wenn im MAT nicht direkt die infektiöse Serogruppe untersucht wird, können die Ergebnisse des MAT falsch-negativ sein. Deshalb ist es wichtig, dass vor allem lokal gehäuft auftretende Serogruppen untersucht werden. Für Europa wird die Untersuchung der Serogruppen Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes und Sejroe empfohlen (ANDRE-FONTAINE, 2006; GEISEN et al., 2007; SCHULLER et al., 2015).

Eine definitive Diagnose einer Leptospirose ist nur bei Nachweis eines Titeranstiegs möglich. Dafür sollte bei symptomatischen Tieren eine zweite Probe nach drei bis fünf Tagen untersucht werden. Ist der Patient noch in einer frühen Phase der Infektion ohne Symptome, sollte ein Abstand von zehn bis 14 Tagen gewählt werden (LEVETT, 2001). Bei vierfachem Anstieg oder Abfall des Antikörper-Titers (zwei Titerstufen) kann die Diagnose Leptospirose gestellt werden (HARTMANN et al., 2013; SCHULLER et al., 2015).

## **6. Therapie der felines Leptospirose**

Katzen erkranken selten an Leptospirose. Wenn sie aber erkranken, entspricht die Therapie der Behandlung der kaninen Leptospirose (HARTMANN et al., 2013). Sie erfolgt sowohl symptomatisch als auch ätiologisch (WEINGART & KOHN, 2012). Die symptomatische Behandlung hängt von der Schwere der Erkrankung ab und richtet sich nach Organmanifestationen. Bei akutem Nierenversagen ist eine Hämodialyse notwendig (HARTMANN et al., 2013). Zur ätiologischen Therapie erhalten alle Patienten in der ersten Phase Breitspektrumpenicilline, wie Amoxicillin oder Ampicillin. Dadurch wird die Vermehrung der Leptospiren unterbunden und die Bakteriämie beendet. Die Verabreichung erfolgt bei Patienten mit gastrointestinalen Symptomen parenteral. Die Dosierung beträgt 20

mg/kg dreimal täglich für Ampicillin und zweimal täglich für Amoxicillin (HARTMANN et al., 2013). Doxycyclin ist das Mittel der Wahl zur Elimination der Leptospiren aus der Niere. Doxycyclin sollte erst verabreicht werden, wenn das Tier nicht mehr erbricht. Es sollte nur oral gegeben werden, da es intravenös zu Schock und subkutan zu Abszessen führen kann. Doxycyclin wird in einer Dosierung von 5 mg/kg zweimal täglich für drei Wochen oral verabreicht. Dadurch wird der Trägerstatus des Tieres beendet (HARTMANN et al., 2013). Auch Katzen, die keine klinischen Symptome zeigen, aber Leptospiren über den Urin ausscheiden, sollten mit Doxycyclin behandelt werden. Dadurch wird die Infektionsgefahr für andere Tiere und den Menschen minimiert (HARTMANN et al., 2013). Eine erneute Infektion mit Leptospiren ist bei einer jagenden Katze allerdings wahrscheinlich (MAYER-SCHOLL et al., 2014).

## **7. Leptospirose als Zoonose**

In der Humanmedizin werden pro Jahr weltweit etwa 300.000 bis 500.000 Fälle von Leptospirose gemeldet (HARTSKEERL, 2006). In einer aktuellen Studie wird die Zahl der weltweit an Leptospirose Erkrankten jährlich auf 1,03 Millionen geschätzt, die Zahl der an Leptospirose Verstorbenen auf 58.900 (COSTA et al., 2015).

Beim Menschen führt eine Infektion mit Leptospiren in der Regel zur klinischen Manifestation der Erkrankung. In der ersten Phase sind häufig grippeähnliche Symptome vorrangig. Neben Fieber können Myalgie, Arthralgie und Kopfschmerzen auftreten. Die unspezifische Symptomatik erschwert die Diagnosefindung. In 90 % der Fälle bleibt die Erkrankung mild und ist oftmals sogar selbstlimitierend. In wenigen Fällen kann es jedoch zu Ikterus, Erbrechen und Übelkeit (Leber- und Nierenversagen) oder schweren respiratorischen Symptome kommen (PLANK & DEAN, 2000).

In Deutschland nahm die Anzahl der an Leptospirose erkrankten Menschen in den letzten Jahren deutlich zu. Im Jahr 2011 wurden knapp über 50 Krankheitsfälle gemeldet. In den Jahren 2012 und 2013 wurden jeweils etwa 100 Krankheitsfälle gemeldet, im Jahr 2014 sogar 160 Krankheitsfälle (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG & ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2014). JANSEN und Mitarbeiter untersuchten 102 bestätigte Leptospirosefälle in Deutschland (JANSEN et al., 2005). Berufliche Aktivitäten (insbesondere landwirtschaftliche

Arbeit, Arbeiten in der Kanalisation, am Schlachthof oder am Bau), Tierkontakte (insbesondere Kontakte mit Hunden und Ratten), Infektionen im häuslichen Rahmen (insbesondere Bewohnen eines Bauernhofes, Gartenarbeit und Arbeiten im Hof) und Freizeitaktivitäten (insbesondere mit Kontakt zu Gewässern) waren verantwortlich für die Infektionen (JANSEN et al., 2005; BROCKMANN et al., 2010; WASINSKI & DUTKIEWICZ, 2013; HOENIGL et al., 2014).

Inwieweit die Katze eine Rolle bei der Infektion von Menschen mit Leptospiren spielt, ist noch unklar. Da Katzen Leptospiren ausscheiden, haben sie zoonotisches Potential und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen (Desinfektion der Hände nach Kontakt mit Urin oder Beutetieren, antibiotische Behandlung der Katze beim Nachweis von Leptospiren im Urin) sollten eingehalten werden. Andererseits wird diskutiert, dass Katzen sogar die Infektionsgefahr ihrer Besitzer reduzieren, indem sie Reservoirwirte (Mäuse und Ratten) beseitigen (CHILDS et al., 1992; LEVESQUE et al., 1995; MUNOZ-ZANZI et al., 2014a).



### **III. PUBLIKATION**

#### **Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany**

**Sonia Weis**

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

**Anna Rettinger, Dr. med. vet.**

Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses,  
Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, Munich, Germany

**Michele Bergmann, Dr. med. vet.**

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

**Julia R. Llewellyn**

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

**Nikola Pantchev, Dr. med. vet.**

IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

**Reinhard K. Straubinger, Prof., Dr. med. vet., Ph.D.**

Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses,  
Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, Munich, Germany

**Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl.  
ECVIM-CA**

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany



## Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany

Sonia Weis<sup>1</sup>, Anna Rettinger<sup>2</sup>, Michele Bergmann<sup>1</sup>,  
 Julia R Llewellyn<sup>1</sup>, Nikola Pantchev<sup>3</sup>,  
 Reinhard K Straubinger<sup>2</sup> and Katrin Hartmann<sup>1</sup>

Journal of Feline Medicine and Surgery  
 1–7

© The Author(s) 2016

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1098612X16634389

jfms.com



### Abstract

**Objectives** Clinical manifestation of infection with *Leptospira* species in cats is rare. Nevertheless, cats can develop specific antibodies against the spirochetes after infection. In Canada, Taiwan and the USA it was recently demonstrated that naturally infected cats can also shed DNA from pathogenic *Leptospira* species in their urine, but the zoonotic potential of infected cats is still unclear. The objective of this study was to demonstrate if outdoor cats in Germany shed DNA from pathogenic *Leptospira* species in their urine. As a second aim, antibody prevalence was determined.

**Methods** Two hundred and fifteen outdoor cats were prospectively recruited. Urine samples were tested by real-time PCR targeting the *lipL32* gene of pathogenic *Leptospira* species. Antibody titres against eight serovars (Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Pomona, Saxkoebing) belonging to seven serogroups (Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe) were determined by microscopic agglutination test.

**Results** Urine samples from 7/215 cats (3.3%; 95% confidence interval [CI] 0.9–5.7) were PCR-positive. Specific antibodies were detected in 35/195 cats (17.9%; 95% CI: 12.5–23.3) with titres ranging from 1:100 to 1:6400. Australis, Bratislava and Grippotyphosa were the most common serovars.

**Conclusions and relevance** Outdoor cats in Germany can shed DNA from pathogenic *Leptospira* species. Therefore, outdoor cats should be considered as a possible source of infection for dogs or humans. Further studies are needed to determine the role of *Leptospira* species as a cause of disease in cats.

**Accepted:** 26 January 2016

### Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic *Leptospira* species, an infection that has been reported in >150 mammalian species.<sup>1</sup> In cats, clinical disease is rare.<sup>2–4</sup> Nevertheless, cats are susceptible to infection and develop specific antibodies after infection.<sup>5–9</sup> Antibody prevalence in cats ranges from 4.8–48.5%.<sup>7,8</sup> In Germany, an antibody prevalence of 20.0% (33/165 cats) was reported in a study from 30 years ago.<sup>9</sup> Hunting rodents is believed to be the main source of infection in cats.<sup>10</sup> Leptospiral DNA was amplified in 288/2973 (9.7%) rodents and shrews in Germany.<sup>11</sup> Infection through contaminated water or urine of cohabiting dogs seems to play a minor role in cats.<sup>10</sup>

After experimental infection, cats rarely developed mild clinical signs (polyuria/polydipsia [PU/PD]),<sup>12</sup> rise

in body temperature<sup>13</sup>). However, macroscopic and microscopic liver and kidney lesions were frequently reported after experimental and natural infection in cats.<sup>2,4,12</sup> Two studies reported an association between the presence of specific antibodies against *Leptospira*

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

<sup>2</sup>Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, Munich, Germany

<sup>3</sup>IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

#### Corresponding author:

Sonia Weis, Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich,  
 Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany  
 Email: soniaweis@hotmail.com

species in cats and PU/PD or kidney disease.<sup>5,8</sup> In France, 14/16 (87.5%) cats with PU/PD vs 32/80 (40.0%) cats without PU/PD had specific antibodies.<sup>8</sup> In Canada, 17/114 (14.9%) cats with kidney disease vs 9/125 (7.2%) clinically healthy cats showed specific antibodies.<sup>5</sup> However, an association between presence of antibodies and renal disease is not reported in all studies. In the USA, antibodies were found in 4/66 (6.1%) azotaemic cats vs 8/75 (10.7%) non-azotaemic cats.<sup>14</sup> Although experimental infection can lead to renal lesions, the clinical relevance of leptospiral infection in field cats is still unclear. The long-term impact of leptospiral infection on cats' health also remains unknown as the longest experimental study only lasted 84 days.<sup>15</sup>

The cats' role as carrier and the zoonotic risk of infected cats is also so far unknown. After experimental infection, cats can intermittently shed leptospires in their urine for several weeks.<sup>12,15</sup> Recently, shedding of DNA from pathogenic *Leptospira* species in naturally infected cats was reported in Canada, Taiwan and the USA,<sup>5,6,16</sup> with a prevalence ranging from 1.6% (in healthy cats in Canada)<sup>5</sup> to 67.8% (in unselected cats in Taiwan).<sup>6</sup> Furthermore, evidence of renal carriage in cats was reported from Reunion Island (Indian Ocean).<sup>17</sup> In kidney samples of 6/21 (28.6%) stray cats, DNA from pathogenic *Leptospira* species was detected.<sup>17</sup> Thus, renal carriage and leptospiuria in naturally infected cats might have been underestimated. Leptospiuric cats could be a potential source of infection for incidental hosts, such as humans.<sup>10</sup> However, in a recent study in Germany, owning an outdoor cat did not correlate with presence of *Leptospira* species antibodies in employees of forestry enterprises.<sup>18</sup> In the USA, cat ownership was even negatively associated with having antibodies against *Leptospira* species.<sup>19</sup> So far, prevalence of leptospiuria in cats in Germany is unknown. Thus, the first aim of this study was to show whether outdoor cats in Germany can shed DNA from pathogenic *Leptospira* species in their urine. As a second goal, the presence of specific antibodies in cats was evaluated.

## Materials and methods

### Sample size calculation

Sample size was calculated a priori using the following formula:  $n = Z^2 \times P \times (1 - P)/d^2$ , with  $n$  being the required sample size,  $Z$  the standard score (for a 95% confidence interval [CI] 1.96),  $P$  the expected prevalence based on literature in proportion of one and  $d$  the precision in proportion of one. On the basis of an assumed prevalence of leptospiral DNA shedding in cats (11.8%)<sup>16</sup> and of antibodies against *Leptospira* species in cats (48.5%),<sup>8</sup> a sample size of 195 cats was required (95% CI; 4.5% precision for prevalence of DNA shedding and 7.0% precision for antibody prevalence).

### Cats

The study was conducted as a prospective trial and was approved by the ethical committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University (LMU) of Munich, Germany (approval number: 12-30-07-13). Two hundred and fifteen cats that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine, LMU, Munich, from July 2013 to March 2015 were included in the study. Only cats were included that were allowed to roam outdoors on a regular basis in the 4 weeks prior to presentation. Cats were presented for various clinical signs or for a routine health check. Cats that had received antibiotics within 4 weeks prior to presentation were excluded. Some cats had received intravenous (IV) fluids (48/215 cats) or diuretics (8/215 cats) prior to sample collection.

Most cats (190/215 cats) were domestic shorthair (DSH). Pure breeds (23/215 cats) and domestic longhairs (DLH; 2/215 cats) were less common. Eighty-three cats were female (64 neutered) and 132 cats were male (122 neutered). Ages ranged from 2 months to 24 years (median age 11 years). The age of seven cats was unknown. The most frequent reasons for presentation were gastrointestinal problems (35/215 cats), chronic kidney disease (CKD; 28/215 cats), neoplasia (25/215 cats) or a routine health check (24/215 cats).

### Sample collection

Urine samples of all cats were collected for other diagnostic purposes (urinalysis or urine culture), depending on the reason for presentation. Follow-up urine samples were examined in two PCR-positive cats. Urine samples were collected via cystocentesis (148/217 samples), free catch (65/217 samples) or urinary catheter (4/217 samples). Sample volumes ranged from 1–50 ml (median volume 4.5 ml). Urine samples were stored at 4°C for a maximum of 24 h after collection.

Blood samples were collected from 195/215 cats and were stored as serum at –20°C until used.

### DNA extraction

Each urine sample was transferred into one or more Eppendorf tubes. Eppendorf tubes were centrifuged ( $15,000 \times g$ , 4°C) for 10 mins, supernatants were discarded and pellets were washed with phosphate-buffered saline and transferred into a single Eppendorf tube. After a second centrifugation ( $15,000 \times g$ , 4°C, 10 mins), the supernatant was discarded, the pellet was resuspended with 180 µl animal tissue lysis buffer (Qiagen) and stored at –20°C until DNA extraction was performed.

A QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) was used to extract DNA from pellets, following the manufacturer's instructions (tissue protocol) except for a shorter lysis period (1 h). To elute DNA, 54 µl AE buffer (Qiagen) was



used. Negative controls were processed after every 10 samples. DNA concentration and quality were determined using the Eppendorf D30 Biophotometer.

#### Standard curve

A urine sample of a strictly indoor living cat was spiked with known quantities of *L. interrogans* serovars Ballum, Bratislava and Grippotyphosa. A Petroff-Hauser chamber (EMS) was used to determine the concentration of leptospires in a 2-week-old culture in liquid Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris medium (Becton Dickinson). To obtain a final concentration of  $1 \times 10^6$  leptospires/ml, the appropriate volume of each serovar was added to 1 ml urine. Dilutions of  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^2$  leptospires/ml were prepared. DNA was extracted and target DNA fragments amplified.

#### Real-time PCR

Primers (forward: 5'-AAGCATTACCGCTTGTGGTG-3'; reverse: 5'-GAACCTCCCATTTTCAGCGATT-3') and TaqManprobe (FAM-5'-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-3'-BHQ1) targeting the *lipL32* gene of pathogenic *Leptospira* species, as described by Stoddard et al,<sup>20</sup> were used. Real-time PCR was performed using the Mx3000P cyclor (Agilent Technologies) and TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Final reaction conditions were 900 nmol/l of each primer, 400 nmol/l of the probe and 2.5 µl DNA extract in a final volume of 25.0 µl. The amplification protocol consisted of 2 mins at 50°C, 10 mins at 95°C and 45 cycles of amplification (95°C for 15 s and 60°C for 60 s), finishing with a cool cycle of 25°C for 10 mins. Clinical specimens were tested in triplicate, dilutions of the standard curve in duplicate. Each run included a single negative control containing PCR water, single DNA extraction controls and a single positive control containing leptospiral DNA. Results were considered positive if positive cycle threshold (Ct) values were recorded in all triplicates. Positive samples were re-amplified in a separate run including the standard curve for an absolute quantification of leptospires.

#### Microscopic agglutination test

A microscopic agglutination test (MAT) was performed as described by Cole et al.<sup>21</sup> Serum samples were tested for eight serovars (Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Pomona, Saxkoebing) belonging to seven serogroups (Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe). Two-fold dilutions of serum from 1:100 to 1:6400 were tested. The titre was recorded as the reciprocal of the highest dilution of serum that agglutinated >50% of leptospires. Titres  $\geq 1:100$  were considered positive.

#### Statistical analysis

Prevalences, including 95% CIs, were calculated for leptospiral DNA shedding and antibodies against *Leptospira* species. The 95% CI was calculated using the following formula (Wald method):  $P \pm d$ , with P being the prevalence found in the study in proportion of one and d being the precision in proportion of one calculated by transposing the mentioned formula to:

$$d = Z \times \sqrt{P \times (1 - P) / n}.$$

## Results

#### Prevalence of DNA shedding

DNA from pathogenic *Leptospira* species was amplified in 7/215 cats (3.3%; 95% CI 0.9–5.7). Negative controls tested negative, positive controls and the standard curve tested positive. The number of leptospires ranged from 393–15,760 leptospires/ml (Table 1). Volumes of PCR-positive urine samples ranged from 2–22 ml (median volume 6.3 ml). Signalment, reason for presentation, major laboratory findings, month of presentation, number of leptospires/ml urine (DNA copies) and MAT titres of the PCR-positive cats are shown in Table 1.

In 2/7 PCR-positive cats (cats 1 and 2, Table 1), follow-up urine samples were examined. In the case of cat 1, urine tested negative for leptospiral DNA 9 months after the first presentation. The urine of cat 2 was positive again for leptospiral DNA 8 months after the cat's first presentation (2901 leptospires/ml). In both cases, no antibiotics were given between the first and the second presentation.

#### Antibody prevalence

Antibodies against *Leptospira* serovars were detected in 35/195 cats (17.9%; 95% CI 12.5–23.3). Most cats had antibodies against serogroup Australis, followed by serogroup Grippotyphosa and Icterohaemorrhagiae. Less common serogroups were Autumnalis, Sejroe and Pomona. Antibodies against serogroup Canicola were not detected. Antibody titres ranged from 1:100 to 1:6400 (Table 2).

The age of cats with antibodies ranged from 1–24 years (median age 11 years). Eleven cats with antibodies were female (10 neutered); 24 cats were male (22 neutered). Most cats with antibodies (34/35 cats) were DSH. One cat was a DLH. The most frequent reasons for presentation in cats with antibodies were CKD (8/35 cats), neoplasia (7/35 cats), hyperthyroidism (5/35 cats), gastrointestinal problems (5/35) or a routine health check (5/35 cats).

High titres, of  $\geq 1:800$ , were found in three cats against serovar Australis and in one cat against serovar Saxkoebing (Table 2). Two of three cats with high antibodies against serovar Australis shed leptospiral DNA in their urine (cats 6 and 7, Table 1). The third cat

**Table 1** Breed, sex, age, reason for presentation, major laboratory findings, month of presentation, number of leptospires/ml urine (DNA copies) and microscopic agglutination test (MAT) titres of urine PCR cats

No	Breed	Sex	Age (years)	Reason for presentation	Major laboratory findings (CBC, clinical chemistry, UA)	Month of presentation	Leptospire/ml urine (DNA copies)	Titre (MAT)
1	DSH	MN	6	Routine health check	Unremarkable	April	393	1:400, Australis
2	DSH	MN	11	Mast cell tumour in spleen and liver	Unremarkable	July	15,760	1:400, Bratislava
3	DSH	MN	8	Foreign body in the pharynx (grass)	Unremarkable	August	9461	1:100, Grippotyphosa
4	DSH	MN	14	Severe anaemia, renal failure, abdominal mass	Non-regenerative anaemia, azotaemia, low USG	October	1649	ND
5	DSH	MN	14	Chronic diarrhoea	Non-regenerative anaemia	January	662	1:400, Australis
6	DSH	FN	6	Seizures	Unremarkable	January	1303	1:100, Autumnalis
7	DSH	FN	1	Acute diarrhoea, coccidiosis	Leukocytosis with left shift, panhypoproteinaemia	March	612	1:200, Bratislava
								1:200, Copenhageni
								1:800, Australis
								1:800, Bratislava
								1:100, Copenhageni

CBC = complete blood count; UA = urinalysis; DSH = domestic shorthair; MN = male neutered; ND = not determined; USG = urine specific gravity; FN = female neutered

**Table 2** Number and percentage of microscopic agglutination test (MAT)-positive results among 195 outdoor cats; 15/35 MAT-positive cats had titres to more than one serovar

Serogroup	Serovar	Number of MAT titres $\geq$ 1:100						Total number of MAT titres $\geq$ 1:100	Percentage of MAT titres $\geq$ 1:100 (95% CI)
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:6400		
Australis	Australis	4	2	8	2	0	1	17	8.7 (4.7–12.7)
	Bratislava	7	3	4	0	0	0	14	7.2 (3.6–10.8)
Autumnalis	Autumnalis	1	1	0	0	0	0	2	1.0 (0.0–2.4)
Canicola	Canicola	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Grippotyphosa	Grippotyphosa	8	1	2	0	0	0	11	5.6 (2.4–8.8)
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	6	1	0	0	0	0	7	3.6 (1.0–6.2)
Pomona	Pomona	1	0	0	0	0	0	1	0.5 (0.0–1.5)
Sejroe	Saxkoebing	1	0	0	0	1	0	2	1.0 (0.0–2.4)
	Total	28	8	14	2	1	1	54	27.7 (21.4–34.0)

CI = confidence interval

(DSH, 17 years, male neutered) had a very high antibody titre against serovar Australis (1:6400) and a low antibody titre against serovar Bratislava (1:400). PCR performed on urine of this cat produced negative results. The cat suffered from hyperthyroidism and CKD. One cat (DSH, 9 years, male neutered) had a high antibody titre of 1:1600 against serovar

Saxkoebing and its urine was negative in PCR testing. This cat suffered from pancreatitis with a moderate prerenal azotaemia.

All cats that shed leptospiral DNA and in which serum for antibody determination was available (6/7 shedding cats) had specific antibodies with titres ranging from 1:100 to 1:800 (Table 1).

## Discussion

More cats (7/215 cats [3.3%, 95% CI 0.9–5.7]) in the present study shed leptospiral DNA in their urine than dogs (3/200 dogs [1.5%, 95% CI 0.3–4.5]) in a study that was recently performed in the same area with the same PCR method.<sup>22</sup> Leptospirosis in dogs in Germany might be less likely owing to the widespread vaccination.<sup>23</sup> Vaccines reduce leptospirosis;<sup>23</sup> thus, vaccinated animals are at lower risk of shedding leptospires in their urine. Antibody prevalence, however, was similar in cats and dogs. Of 200 dogs, 17.0% (95% CI 12.3–22.8) had antibodies against non-vaccinal serogroups,<sup>22</sup> while of 195 cats, 17.9% (95% CI 12.5–23.3) had antibodies. Vaccination against leptospirosis in dogs can lead to development of antibodies against both vaccinal and non-vaccinal serogroups.<sup>24</sup> In some dogs, vaccine-induced antibodies can persist for 1 year.<sup>24</sup> In the study that evaluated antibodies against leptospires in dogs in Germany, 144/145 dogs with known vaccination status had been vaccinated with a bivalent leptospirosis vaccine.<sup>22</sup> Thus, antibody prevalence due to exposure in dogs might indeed be lower and exposure in cats seems to be even more common than in dogs.

Prevalence of urinary shedding in the present study (7/215 cats [3.3%; 95% CI 0.9–5.7]) was similar to that reported in cats in Canada (8/238 cats [3.4%]).<sup>5</sup> A comparable study population (clinic population) and a similar environment (mostly urban) are likely the reasons. However, in the Canadian study only 142/239 cats had outdoor access,<sup>5</sup> while in the present study all cats roamed outdoors regularly. Consequently, cats in the present study were at higher risk of infection. A higher prevalence was reported in the USA (10/85 cats [11.8%]), but only stray and feral shelter cats were included (preselected population),<sup>16</sup> which, of course, are more likely to feed on rodents that harbour an infection.<sup>5,10</sup> In Taiwan, 80/118 cats (67.8%) shed DNA from pathogenic *Leptospira* species in their urine,<sup>6</sup> indicating a much higher prevalence of infection than in Germany. Leptospirosis is endemic in Taiwan, especially after typhoon and flood seasons.<sup>6,25</sup> Additionally, 159/233 cats included in the Taiwanese study were stray cats with a high risk of infection.<sup>6</sup> However, even the lower prevalence in Germany is alarming as significant amounts of leptospiral DNA and also multiple positive samples were detected (Table 1), suggesting a possible long-term shedding or a high risk of exposure in some cats.<sup>12,15</sup>

After experimental infection, cats can remain carriers of leptospires for several weeks.<sup>12,15</sup> In the present study, a follow-up urine sample from one cat that shed leptospiral DNA was PCR-positive 8 months after the first presentation. Thus, shedding cats could possibly play an important role for continuous environmental

contamination. However, reinfection would also have been possible in this case, as the cat regularly went outdoors.

Interestingly, two cats that shed leptospiral DNA were presented in January. In dogs, transmission is unlikely in winter months in Germany as leptospires are short-lived in stagnant waters when temperature is low.<sup>1,26</sup> However, carriers of *Leptospira* species, like rodents, can be infected for their entire life,<sup>26</sup> and thus a seasonal occurrence, although present in dogs in Germany, is less likely in cats.

The *lipL32* PCR used in the present study has been shown to be 100% specific,<sup>20,27</sup> and negative controls were consistently negative. In this study, only urine samples were considered PCR-positive, when Ct values were positive in all three samples of its triplicate. Furthermore, validity of PCR results was confirmed by the fact that all positive cats also had antibodies. Hence, false-positive PCR results are extremely unlikely. However, the prevalence found in the present study might underestimate the true infection rate of the population as intermittent shedding of leptospires is common.<sup>26</sup> Urine volumes in this study ranged from 1–50 ml. As shedding of low numbers of leptospire organisms is possible, false-negative results might have occurred in samples with small volumes. However, median volumes of PCR-positive urine samples (6.3 ml) were not significantly higher compared with median volumes of PCR-negative urine samples (4.5 ml).

Some cats had received IV fluids or diuretics prior to sample collection. IV fluids or diuretics reduce urine osmolality and might create a more favourable condition for the survival of leptospires.<sup>28</sup> Nevertheless, none of the PCR-positive cats were treated with IV fluids or diuretics prior to sample collection.

Overall, antibody prevalence in the present study (35/195 cats [17.9%, 95% CI 12.5–23.3]) was comparable to antibody prevalence found in cats in Germany about 30 years ago (33/165 cats [20.0%]).<sup>9</sup> Antibodies against serogroups Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Sejroe were determined by MAT in both the present and the previous study.<sup>9</sup> Prevalences of antibodies to most of these serogroups were similar in both studies. However, the prevalence of antibodies to serogroup Icterohaemorrhagiae was higher in the present study (3.6%) than in the previous one (0.0%).<sup>9</sup> Rats are carriers of serogroup Icterohaemorrhagiae.<sup>26,29</sup> Accordingly, these findings suggest rats as the source of infection for cats in the present study. However, MAT results should be interpreted with caution. In humans, the predominant serogroup with a titre  $\geq 1:100$  correctly predicted only 46.4% of all serovars isolated.<sup>30</sup> In dogs vaccinated against leptospirosis, cross-reactivity to non-vaccinal serogroups in the MAT was demonstrated,<sup>24</sup> and there is evidence that this might be



similar in cats.<sup>14</sup> In a recent study, two specific pathogen-free cats were vaccinated with a quadrivalent canine vaccine against leptospirosis. Both cats developed antibodies against vaccinal and non-vaccinal serogroups.<sup>14</sup> It is likely that in naturally infected cats MAT results are also not reliable for identification of the infecting serogroup.

Cats that shed leptospiral DNA in the present study were either clinically healthy (1/7 cats) or showed various clinical signs (6/7 cats). Most cats (4/7 cats) had unremarkable laboratory parameters. Only 1/7 cats suffered from renal azotaemia (Table 1). Thus, obviously cats can shed leptospiral DNA in their urine, regardless of their health status. In the present study, 5/24 (20.8%, 95% CI 4.6–37.0) clinically healthy cats and 8/28 (28.6%, 95% CI 11.9–45.3) cats with CKD had antibodies against *Leptospira* species. Therefore, in the present study no association seemed to be present between occurrence of antibodies against *Leptospira* species and renal disease. However, re-evaluation in further studies is recommended as sample sizes of healthy cats and cats suffering from CKD in the present study were low.

Two of the four cats with high titres, of  $\geq 1:800$ , also shed leptospiral DNA in their urine. Urine samples of the two other cats with titres  $\geq 1:800$  were PCR-negative. These negative results can be explained by intermittent shedding as intermittent shedding of leptospires is a common finding.<sup>26</sup> Furthermore, false-negative results are possible in these two cats due to relatively small urine volumes examined (1.5 ml and 5.0 ml, respectively).

Limitations of this study are that follow-up urine samples could only be obtained in 2/7 cats that shed leptospiral DNA. In this study, DNA from pathogenic *Leptospira* species was detected, which cannot predict viability of leptospires. The viability of leptospires in the cats' urine and the zoonotic potential of the shedding cats has to be further elucidated.

### Conclusions

Prevalence of shedding of DNA from pathogenic *Leptospira* species in outdoor cats in Germany was 3.3%, while the prevalence of specific antibodies was 17.9%. As a result, outdoor cats in Germany are exposed to leptospires and regularly shed leptospiral DNA. The role of cats as a source of infection likely has been underestimated and the zoonotic risk of shedding cats, as well as the potential of leptospires to cause disease in cats, has to be further elucidated.

**Acknowledgements** We are grateful for the statistical support provided by Dr med vet Sven Reese (Institute of Veterinary Anatomy, LMU Munich).

**Conflict of interest** The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

**Funding** The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

### References

- 1 Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, et al. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1–13.
- 2 Arbour J, Blais MC, Carioto L, et al. Clinical leptospirosis in three cats (2001–2009). *J Am Anim Hosp Assoc* 2012; 48: 256–260.
- 3 Beaudu-Lange C and Lange E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. *Rev Vet Clin* 2014; 49: 115–122.
- 4 Bryson DG and Ellis WA. Leptospirosis in a British domestic cat. *J Small Anim Pract* 1976; 17: 459–465.
- 5 Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, et al. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 284–293.
- 6 Chan KW, Hsu YH, Hu WL, et al. Serological and PCR detection of feline *Leptospira* in Southern Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; 14: 118–123.
- 7 Markovich JE, Ross L and McCobb E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 688–689.
- 8 Luciani O. Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospires [thesis in French]. National Veterinary School of Nantes, 2004.
- 9 Bätza HJ and Weiss R. Zum Vorkommen von *Leptospira*-Antikörpern in Katzenseeren [in German]. *Kleintierpraxis* 1987; 32: 171–172.
- 10 Hartmann K, Egberink H, Pennisi MG, et al. *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 576–581.
- 11 Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, et al. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 7562–7574.
- 12 Fessler JF and Morter RL. Experimental feline leptospirosis. *Cornell Vet* 1964; 54: 176–190.
- 13 Shophet R and Marshall RB. An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. *Br Vet J* 1980; 136: 265–270.
- 14 Shropshire SB, Veir JK, Morris AK, et al. Evaluation of the *Leptospira* species microscopic agglutination test in experimentally vaccinated cats and *Leptospira* species seropositivity in aged azotemic client-owned cats. *J Feline Med Surg*. Epub ahead of print 13 July 2015. DOI: 0.1177/1098612X15593902 2015.
- 15 Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, et al. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *Int J Zoonoses* 1985; 12: 111–119.
- 16 Fenimore A, Carter K and Lunn KF. Detection of leptospiuria in shelter cats in Colorado [abstract]. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 783.
- 17 Desvars A, Naze F, Benneveau A, et al. Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). *Epidemiol Infect* 2013; 141: 1154–1165.
- 18 Jurke A, Bannert N, Brehm K, et al. Serological survey of *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Leptospira* spp., *Echinococcus*,

- Hanta-, TBE- and XMR-virus infection in employees of two forestry enterprises in North Rhine-Westphalia, Germany, 2011–2013. *Int J Med Microbiol* 2015; 305: 652–662.
- 19 Childs JE, Schwartz BS, Ksiazek TG, et al. Risk factors associated with antibodies to leptospires in inner-city residents of Baltimore: a protective role for cats. *Am J Public Health* 1992; 82: 597–599.
  - 20 Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 247–255.
  - 21 Cole JR, Jr, Sulzer CR and Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973; 25: 976–980.
  - 22 Llewellyn JR, Krupka-Dyachenko I, Rettinger AL, et al. Prevalence of *Leptospira* urinary shedding in healthy dogs from Southern Germany [abstract]. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 727.
  - 23 Schreiber P, Martin V, Najbar W, et al. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet Microbiol* 2005; 108: 113–118.
  - 24 Martin LE, Wiggans KT, Wennogle SA, et al. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 789–792.
  - 25 Su HP, Chan TC and Chang CC. Typhoon-related leptospirosis and melioidosis, Taiwan, 2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1322–1324.
  - 26 Levett PN. *Leptospirosis*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296–326.
  - 27 Fink JM, Moore GE, Landau R, et al. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27: 159–166.
  - 28 Nervig RM and Garrett LA. Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1197–1200.
  - 29 Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757–771.
  - 30 Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 447–452.



## IV. DISKUSSION

Katzen erkranken nur selten an Leptospirose (HARTMANN et al., 2013). Bisher wurde auch die epidemiologische Bedeutung der Katze für die Leptospirose zumeist als gering eingestuft (SEMMELE, 1954). Aktuelle Studien aus den USA (FENIMORE et al., 2012), Kanada (RODRIGUEZ et al., 2014) und Taiwan (CHAN et al., 2014) konnten jedoch eine Ausscheidung pathogener *Leptospira* spp. über den Urin bei Katzen nachweisen. Damit ist eine von der Katze ausgehende Infektionsgefahr denkbar. In Europa gibt es bislang keine Studien zur Ausscheidung von Leptospiren über den Urin bei der Katze. Ziel der Studie war es daher, Urinproben von Freigängerkatzen in Deutschland mittels qPCR auf das Vorhandensein von DNA pathogener *Leptospira* spp. zu untersuchen. Außerdem wurde die Prävalenz von Antikörpern gegen Leptospiren bei diesen Katzen ermittelt.

Die vorliegende Studie ermittelte eine Antikörperprävalenz von 17,9 % (35 von 195 Katzen; 95 % CI: 12,5–23,3). Andere Autoren berichteten von niedrigeren Prävalenzen (Tabelle 1). In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Freigänger untersucht, während andere Studien auch reine Wohnungskatzen eingeschlossen haben. Freilaufende Katzen haben insbesondere durch die Möglichkeit, Nagetiere zu jagen, ein höheres Infektionsrisiko als Katzen, welche ausschließlich in der Wohnung gehalten werden (HARTMANN et al., 2013). Nur wenige Studien ermittelten deutlich höhere Prävalenzen von 33,3 % in Griechenland (MYLONAKIS et al., 2005) und von 48,5 % in Frankreich (LUCIANI, 2004). Allerdings wurde in diesen Studien der Testtrennwert deutlich niedriger gewählt, bei  $\geq 1:50$  (MYLONAKIS et al., 2005) beziehungsweise (bzw.)  $\geq 1:40$  (LUCIANI, 2004) (Tabelle 1).

Die letzte Studie in Deutschland zur Antikörperprävalenz bei der Katze wurde in Berlin durchgeführt (ROSE et al., 2016) (Tabelle 1). Mittels MAT wurde auf 17 Serovare getestet. Zwölf von 48 Freigängerkatzen (25,0 %) hatten Antikörper gegen Leptospiren mit einem Titer  $\geq 1:100$ . Die Katzen hatten unter anderem Titer gegen mehrere Serovare. Die meisten Titer (sieben von 18 Titern) bei Freigängerkatzen wurden gegen die Serogruppe Pomona erzielt. Auch eine von 41 Wohnungskatzen hatte einen Titer von 1:100 gegen die Serogruppe Pomona.

Diese Katze lebte mit Freigängerkatzen zusammen. Die Serogruppe Pomona konnte in der vorliegenden Studie nur einmal festgestellt werden mit einem niedrigen Titer von 1:100. In der vorliegenden Studie war hingegen die Serogruppe Australis (Serovare Australis und Bratislava) am häufigsten vertreten mit 31 von 54 Titern  $\geq 1:100$ . In Berlin scheint also bei Katzen eine Infektion mit der Serogruppe Pomona am häufigsten zu sein, während in München das Risiko, sich mit Australis zu infizieren, am größten ist. Denkbar ist, dass sich Katzen im Berliner Umland in Stallungen von Nutztieren, welche teilweise Reservoirtiere für die Serogruppe Pomona darstellen, infizieren (Tabelle 5). Von 377 MAT-positiven Wildschweinen aus Polen hatten 3,1 % einen Titer  $\geq 1:100$  gegen das Serovar Pomona und nur 1,8 % gegen das Serovar Bratislava (Serogruppe Australis) (ZMUDZKI et al., 2016). In Berlin wagen sich Wildschweine auch in bewohnte Gebiete und suchen in Gärten nach Nahrung. Dadurch könnten auch Katzen mit der Serogruppe Pomona infiziert werden. Im süddeutschen Raum scheint die Infektion durch Nagetiere häufiger zu sein (Tabelle 5). Eine Berliner Studie fand heraus, dass Hunde mit Leptospirose am häufigsten Antikörper gegen die Serogruppe Australis (28,0 %) hatten. Am zweithäufigsten war Grippotyphosa (18,0 %) und an dritter Stelle kam Pomona (14,0 %). Antikörper gegen Serogruppen, gegen die geimpft wurde, wurden nicht ausgewertet (MAYER-SCHOLL et al., 2013). In München wurden Hunde mit Leptospirose mittels MAT untersucht. Das am häufigsten nachgewiesene Serovar (ohne Auswertung von geimpften Serogruppen) war Grippotyphosa (Serogruppe Grippotyphosa) (31,0 %), gefolgt von Saxkoebing (Serogruppe Sejroe) (23,8 %) und Bratislava (Serogruppe Australis) (7,1 %) (GEISEN et al., 2008). Auch bei Hunden gibt es also regionale Unterschiede in der Prävalenz einzelner Serovare. Hunde und Katzen scheinen sich außerdem mit unterschiedlichen Serovaren zu infizieren. Ursächlich hierfür könnte sein, dass sich Katzen zumeist durch die Jagd von Nagetieren infizieren und Hunde vor allem über Kontakt zu infektiösem Wasser (HARTMANN et al., 2013).

In Deutschland wurde eine Studie zur Antikörperprävalenz bei der Katze im Jahr 1987 durchgeführt (BÄTZA & WEISS, 1987). In dieser Studie hatten 33 von 165 (20,0 %) Katzen Antikörpertiter  $\geq 1:50$  gegen Leptospiren. Werden nur Titer  $\geq 1:100$  als positiv gewertet, sinkt die Prävalenz auf 12,1 % (20 von 165 Katzen). In dieser Studie wurden nicht ausschließlich Freigänger eingeschlossen. Das könnte

die etwas geringere Prävalenz im Vergleich zur vorliegenden Studie aus Deutschland (17,9 %; 35 von 195 Katzen; 95 % CI: 12,5–23,3) erklären. Die Prävalenzen von Antikörpern gegen die meisten Serogruppen waren in beiden Studien ähnlich. Interessanterweise war die Prävalenz von Antikörpern gegen die Serogruppe Icterohaemorrhagiae jedoch in der aktuellen Studie (3,6 %) höher als in der Studie von 1987 (0,0 %). Ratten stellen ein Reservoir für die Serogruppe Icterohaemorrhagiae dar (LEVETT, 2001). In der aktuellen Studie könnten Ratten somit eine Rolle als Infektionsquelle für Katzen gespielt haben. Von den sieben Katzen mit Antikörpern gegen die Serogruppe Icterohaemorrhagiae lebten drei Katzen in München und vier in ländlichen Gegenden Bayerns. Ratten kommen sowohl in der Stadt als auch auf dem Land vor und können Überträger von Leptospiren sein (BHARTI et al., 2003). Die infektiöse Serogruppe ist mittels MAT allerdings nicht mit Sicherheit zu ermitteln. So stimmte beim Menschen die vorherrschende Serogruppe mit einem Titer  $\geq 1:100$  im MAT nur in 46,6 % der Fälle mit den isolierten Serovaren überein (LEVETT, 2003). In einer Studie wurden zwei spezifisch pathogenfreie (SPF) Katzen mit einem quadrivalenten Impfstoff gegen Leptospirose geimpft (SHROPSHIRE et al., 2015). Eine Katze hatte zwölf Tage nach der ersten Impfung Antikörper gegen ein nicht geimpftes Serovar. Beide Katzen hatten fünf Tage nach der zweiten Impfung (14 Tage nach der ersten Impfung) Antikörper gegen ein nicht geimpftes Serovar und 17 Tage später Antikörper sowohl gegen geimpfte als auch gegen nicht-geimpfte Serovare (SHROPSHIRE et al., 2015). Dies lässt vermuten, dass der MAT auch bei infizierten Katzen nicht mit Sicherheit die infektiöse Serogruppe bestimmen kann. Zudem ist der MAT sehr subjektiv in der Auswertung und unterschiedliche Labore können bei ein- und derselben Probe unterschiedliche Ergebnisse erzielen (MILLER et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden bei vier Katzen hohe Antikörper-Titer ( $\geq 1:800$ ) festgestellt (höchster gemessener Titer: 1:6.400). Hohe Antikörper-Titer ( $\geq 1:1.600$ ) konnten auch in anderen Studien bei Katzen festgestellt werden (BÄTZA & WEISS, 1987; MYLONAKIS et al., 2005; MILLAN et al., 2009; MARKOVICH et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2014; ROSE et al., 2016). Diese hohen Titer können auf eine akute Infektion hinweisen (RODRIGUEZ et al., 2014). Um eine akute Infektion bestätigen zu können, wäre eine zweifache Probenentnahme in einem Abstand von einigen Tagen notwendig gewesen. In

vielen älteren Studien konnten bei Katzen jedoch nur niedrige Antikörper-Titer ( $\leq 1:400$ ) nachgewiesen werden (HATHAWAY & BLACKMORE, 1981; AGUNLOYE & NASH, 1996; DESVARS et al., 2013). Einige Forscher vermuteten, dass die Katze entweder mit der Bildung niedriger Antikörper-Titer auf eine Infektion reagiert oder dass Antikörper-Titer bei der Katze rasch wieder abfallen (SHOPHET, 1979; SHOPHET & MARSHALL, 1980). Eine weitere Überlegung ist, dass niedrige Titer bei der Katze vorwiegend Kreuzreaktionen mit anderen Leptospiren-Serogruppen darstellen, auf die nicht getestet wird. Beim Hund oder beim Menschen werden meist Serogruppen bestimmt, die lokal häufig sind. Möglicherweise beruht die Infektion bei der Katze jedoch auf anderen Serogruppen, die in den Routineuntersuchungen nicht erfasst werden (MARKOVICH et al., 2012).

In manchen Studien wurden, wie in der vorliegenden Studie, nur freilaufende Katzen eingeschlossen (MARKOVICH et al., 2012; DESVARS et al., 2013; OBRENOVIC et al., 2014). In anderen Studien wurden auch reine Wohnungskatzen untersucht (MYLONAKIS et al., 2005; LAPOINTE et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2014). Freilaufende Katzen sind gefährdeter, sich mit Leptospiren zu infizieren, da sie häufig Nager jagen. Nagetiere stellen ein Reservoir für Leptospiren dar. In Deutschland ist jeder zehnte Nager oder Spitzmaus mit pathogenen Leptospiren infiziert (MAYER-SCHOLL et al., 2014). Wohnungskatzen infizieren sich seltener. Bei ihnen erfolgt die Infektion beispielsweise über andere Hunde oder Katzen oder, in Einzelfällen, durch die Jagd im Haus (ARBOUR et al., 2012).

In der vorliegenden und einigen anderen Studien wurden nur Klinikpatienten eingeschlossen (AGUNLOYE & NASH, 1996; MYLONAKIS et al., 2005; LAPOINTE et al., 2013). Andere Studien untersuchten hingegen nur Streunerkatzen, Katzen aus Tierheimen oder Auffangstationen (MARKOVICH et al., 2012; DESVARS et al., 2013; OBRENOVIC et al., 2014). Letztere sind durch den engen Kontakt zueinander und durch das Leben im Freien und die regelmäßige Jagd einem höheren Infektionsdruck ausgesetzt.

Die unterschiedliche Prävalenz in den verschiedenen Studien ist sicherlich auch damit zu erklären, dass das Vorkommen von Leptospiren regional schwankt. Tropische Regionen bilden eine bessere Lebensgrundlage für die Wärme und Feuchtigkeit liebenden Bakterien (CHAN et al., 2014). Ländliche oder städtische

Gegenden (SEMMELE, 1954) können ebenfalls zu Unterschieden in der Prävalenz bei Katzen führen. In Chile wurde bei Katzen auf dem Land eine Antikörper-Prävalenz von 25,2 % gefunden, in der Stadt hingegen eine Prävalenz von 1,8 % (AZÓCAR-AEDO et al., 2014). Ein Grund hierfür könnte die stärkere Verbreitung von Reservoirwirten (vor allem Nagetiere, aber auch Nutztiere) auf dem Land sein.

In der vorliegenden Studie war das mediane Alter der MAT-positiven Katzen identisch mit dem medianen Alter der nicht-infizierten Katzen (elf Jahre). In anderen Studien zur Antikörperprävalenz wiesen ältere Katzen hingegen häufiger Antikörper gegen Leptospiren auf (LARSSON et al., 1984; MYLONAKIS et al., 2005). In einer experimentellen Studie konnten bei Katzen 61 Tage nach Infektion noch Antikörper festgestellt werden (FESSLER & MORTER, 1964). In einer aktuellen Studie konnten bei einer Katze 30 Tage nach Impfung mit einem quadrivalenten Impfstoff noch Antikörper gegen Leptospiren festgestellt werden (SHROPSHIRE et al., 2015). Es ist denkbar, dass Antikörper bei Katzen über mehrere Monate nach Infektion nachweisbar sind. Katzen könnten somit noch Titer aufweisen, obwohl die Infektion schon diverse Monate zurückliegt.

In der vorliegenden Studie schieden 3,3 % (sieben von 215 Katzen; 95 % CI: 0,9–5,7) der untersuchten Freigängerkatzen Leptospiren-DNA über den Urin aus. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen einer Studie in Kanada, in der 3,4 % der untersuchten Katzen (acht von 238 Katzen) Leptospiren-DNA über den Urin ausschieden (RODRIGUEZ et al., 2014). Dies ist wahrscheinlich auf eine vergleichbare Studienpopulation und eine vergleichbare Umgebung zurückzuführen. In beiden Studien bestand das Patientenkollektiv aus Klinikpatienten in einer städtischen Region. Allerdings wurden in Kanada neben Freigängerkatzen auch Wohnungskatzen (97 von 239 Katzen) in die Studie eingeschlossen (RODRIGUEZ et al., 2014). Da Wohnungskatzen einem geringeren Infektionsdruck ausgesetzt sind, könnte die Prävalenz im Vergleich zu der aktuellen Studie aus Deutschland unterschätzt worden sein. In Kanada wurde eine konventionelle PCR (Primer G1/G2, B64-I/B64-II) zur Untersuchung der Urinproben eingesetzt, in der vorliegenden Studie hingegen eine qPCR (*lipL32*). FINK und Mitarbeiter fanden, dass Echtzeit-PCR-Verfahren eine 100-fach höhere Sensitivität aufweisen als konventionelle PCR-Techniken (FINK et al., 2015). Es ist somit denkbar, dass die Studie aus Kanada die Prävalenz der Ausscheidung

von Leptospiren-DNA über den Urin bei Katzen unterschätzte.

In den USA konnte bei 11,7 % der untersuchten Katzen (zehn von 85 Katzen) Leptospiren-DNA im Urin festgestellt werden (FENIMORE et al., 2012). Während in der vorliegenden Studie und in Kanada ausschließlich Katzen eingeschlossen wurden, die an Kliniken vorgestellt wurden, wurden in den USA streunende Katzen und Katzen aus Auffangstationen getestet. Diese haben durch den Aufenthalt im Freien (insbesondere durch die Jagd von Nagern) und den engen Kontakt zueinander ein höheres Infektionsrisiko. Ein anderer Grund für die höhere Prävalenz bei den Katzen in den USA könnte die Primerwahl bei der PCR sein. FENIMORE und Mitarbeiter verwendeten eine 16S-rRNA-qPCR, welche ausschließlich DNA pathogener *Leptospira* spp. nachweist (FENIMORE et al., 2012). Die Spezifität dieser PCR beträgt bei der Untersuchung von Urinproben nur 91,5 % (VILLUMSEN et al., 2012). Gerade bei Spontanurin ist die Gefahr von Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien groß (VILLUMSEN et al., 2012). So erhielten FINK et al. 13,3 % falsch positive Ergebnisse bei der Untersuchung von Spontanurin mittels 16S-rRNA-PCR (FINK et al., 2015). Da die Studie in den USA Spontanurin untersuchte und nur eine von zehn positiven Proben als *Leptospira* spp. sequenziert wurde (FENIMORE et al., 2013), sind falsch positive Ergebnisse wahrscheinlich.

Die höchste Prävalenz von Leptospiren-DNA in Urinproben von Katzen wurde in Taiwan festgestellt. Sie lag dort bei 67,8 % (80 von 118 Katzen) (CHAN et al., 2014). Der Großteil der Katzen, die in die Studie eingeschlossen wurden (92 von 118 Katzen), waren Streuner. Sechszwanzig von 118 Katzen waren hingegen Hauskatzen. Die Streuner schieden mehr als doppelt so häufig Leptospiren über den Urin aus im Vergleich zu den Hauskatzen (77,2 %; 34,6 %) (CHAN et al., 2014). Einen großen Einfluss auf die hohe Prävalenz hatte vermutlich die geografische Lage. Taiwan hat ein subtropisches bis tropisches Klima und wird regelmäßig aufgrund starker Regenfälle überschwemmt. Dies sind optimale Bedingungen für die Feuchtigkeit und Wärme liebenden Leptospiren (CHAN et al., 2014). In dieser Studie wurde bei der Untersuchung von zwölf Proben die 16S-rRNA-PCR verwendet. Da dieses Protokoll sowohl pathogene als auch saprophytäre Spezies nachweist (MERIEN et al., 1992), wurden nur die Proben als positiv gewertet, welche im Anschluss als pathogene *Leptospira* spp. sequenziert werden konnten (CHAN et al., 2014). Falsch positive Ergebnisse sind

somit, im Gegensatz zur Studie aus den USA, unwahrscheinlich. Die meisten Proben (106 von 118 Proben) wurden mit G1/G2-Primern untersucht, welche alle pathogenen *Leptospirenspezies* nachweisen mit Ausnahme von *L. kirschneri* (GRAVEKAMP et al., 1993; CHAN et al., 2014). Konventionelle PCR-Assays weisen eine 100-fach niedrigere Sensitivität auf (FINK et al., 2015). Somit ist es denkbar, dass die tatsächliche Prävalenz in Taiwan in dieser Studie unterschätzt wurde.

Falsch positive PCR-Ergebnisse sind in der vorliegenden Studie unwahrscheinlich. Die verwendete *lipL32*-PCR ist zu 100 % spezifisch (STODDARD et al., 2009; VILLUMSEN et al., 2012) (Tabelle 6). Außerdem waren alle PCR-positiven Katzen, bei denen ein MAT durchgeführt wurde (sechs von sieben Katzen) auch im MAT positiv. Leptospiren werden häufig intermittierend ausgeschieden (LEVETT, 2001). Die untersuchte Urinmenge war zudem begrenzt (medianes Volumen: 4,5 ml). Dies könnte den Nachweis sehr geringer Leptospirenzahlen erschweren. In der Tat war das mediane Urinvolumen der PCR-positiven Katzen mit 6,3 ml höher als das mediane Urinvolumen der gesamten Studienpopulation. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Falsch negative Ergebnisse sind dennoch wahrscheinlich.

In der vorliegenden Studie hatten 48 von 215 Katzen intravenöse Infusionen und acht von 215 Katzen Diuretika (Furosemid oder Mannitol) vor Entnahme der Urinproben erhalten. NERVIG und GARRETT zeigten, dass aus 57,1 % der Urinproben von experimentell mit Leptospiren infizierten Kälbern nach Gabe von Furosemid Leptospiren angezüchtet werden konnten. Aus Urinproben, welche mittels manueller Stimulation gewonnen wurden, konnten dagegen keine Leptospiren angezüchtet werden (NERVIG & GARRETT, 1979). Die Verdünnung des Urins nach Gabe von Furosemid könnte die Ursache hierfür sein (NERVIG & GARRETT, 1979). Der pH-Wert von Kälberurin liegt normalerweise im sauren Bereich. Durch die Verdünnung des Urins wird ein besseres Milieu für die Leptospiren geschaffen und somit die Überlebenszeit der Leptospiren im Urin verlängert, da Leptospiren einen neutralen pH-Bereich bevorzugen (BHARTI et al., 2003). Intravenöse Flüssigkeitsgaben könnten denselben Effekt haben. Nichtsdestotrotz erhielt in der vorliegenden Studie keine der sieben PCR-positiven Katzen Infusionen oder Diuretika vor Probenentnahme.

Bei einer PCR-positiven Katze konnte in einer Folgeurinprobe acht Monate nach

Erstvorstellung erneut Leptospiren-DNA festgestellt werden. Zwischen der ersten und der zweiten Vorstellung wurde keine Antibiose verabreicht. In zwei experimentellen Studien wurden Leptospiren über acht Wochen lang im Urin nachgewiesen (FESSLER & MORTER, 1964; LARSSON et al., 1985). Eine Ausscheidung von Leptospiren-DNA über den Urin bis zu acht Monate nach Infektion ist denkbar und unterstreicht die potentielle Bedeutung der Katze für die Verbreitung von Leptospiren in der Umwelt. Da diese Katze jedoch zwischen der ersten und der zweiten Vorstellung Freigang hatte, ist nicht nur eine kontinuierliche Ausscheidung über den Zeitraum, sondern auch eine Reinfektion denkbar. Jeder zehnte Nager ist in Deutschland mit Leptospiren infiziert (MAYER-SCHOLL et al., 2014). Eine jagende Katze kann sich deshalb ständig neu infizieren. Bei einer weiteren PCR-positiven Katze konnte eine Folgeprobe nach neun Monaten untersucht werden. In diesem Fall konnte keine Leptospiren-DNA mehr im Urin nachgewiesen werden.

Zwei von sieben PCR-positiven Katzen wurden im Januar vorgestellt. Hunde infizieren sich zumeist indirekt über infektiöses Gewässer mit Leptospiren (SCHULLER et al., 2015). Die Infektionsgefahr ist in warmen Monaten höher als im Winter und die meisten Hunde mit Leptospirose werden im Sommer und Herbst vorgestellt (GEISEN et al., 2007). Katzen meiden Gewässer normalerweise. Bei ihnen steht die direkte Infektion durch die Jagd von Reservoirwirten (Nagetiere) im Vordergrund (HARTMANN et al., 2013). Da diese Leptospiren lebenslang beherbergen können, ist bei Katzen im Gegensatz zum Hund die Infektionsgefahr nicht saisonal.

In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen Azotämie und dem Vorhandensein von Antikörpern gegen Leptospiren sowie der Ausscheidung von Leptospiren-DNA über den Urin bei der Katze gesehen werden. Fünf von 24 gesunden Katzen (20,8 %; 95 % CI: 4,6–37,0) und acht von 28 Katzen mit CNE (28,6 %; 95 % CI: 11,9–45,3) hatten in der vorliegenden Studie Antikörper gegen Leptospiren. Nur eine von sieben PCR-positiven Katzen hatte eine renale Azotämie. Eine der sieben PCR-positiven Katzen war klinisch gesund, sechs zeigten hingegen unterschiedliche Symptome. Die Ausscheidung von Leptospiren-DNA sowie die Bildung von Antikörpern gegen Leptospiren kommen folglich sowohl bei kranken als auch bei gesunden Katzen vor. SHROPSHIRE und Mitarbeiter konnten ebenfalls keinen Zusammenhang



zwischen Azotämie und dem Vorhandensein von Antikörpern gegen Leptospiren bei der Katze nachweisen. Acht von 75 nicht azotämischen Katzen (10,7 %) waren MAT-positiv, während nur vier von 66 azotämischen Katzen (6,1 %) MAT-positiv waren (SHROPSHIRE et al., 2015). Zwei Studien hingegen ermittelten einen Zusammenhang zwischen PU/PD oder Nierenerkrankungen und dem Vorhandensein von Leptospiren-Antikörpern bei Katzen. RODRIGUEZ und Mitarbeiter wiesen bei 17 von 114 nierenkranken Katzen (14,9 %; 95 % CI: 8,3–21,6) in Kanada Antikörper nach, während nur neun von 125 gesunden Katzen (7,2 %; 95 % CI: 2,2–12,2) Antikörper hatten (RODRIGUEZ et al., 2014). In Frankreich hatten 14 von 16 Katzen mit PU/PD (87,5 %) Antikörper, während nur 32 von 80 Katzen ohne PU/PD (40,0 %) Antikörper aufwiesen (LUCIANI, 2004). Unklar bleibt, ob Leptospiren tatsächlich einen Beitrag zur Entstehung von CNE leisten oder ob womöglich Katzen mit CNE prädisponiert sind, sich sekundär mit Leptospiren zu infizieren. Dies wäre denkbar, da bei CNE der Urin schlecht konzentriert ist. Somit könnte er ein besseres Nährmedium für die Leptospiren darstellen als gut konzentrierter, saurer Urin. Es wäre auch denkbar, dass der Antikörper-Titer von gesunden Katzen schneller absinkt als bei Katzen mit CNE aufgrund der nur sehr kurzen Überlebenszeit der Leptospiren im gut konzentrierten und sauren Urin. Nichtsdestotrotz waren Katzen mit CNE in Kanada nicht häufiger leptospirurisch als klinisch gesunde Katzen (RODRIGUEZ et al., 2014).

Bisher wurde die Katze als nicht sehr empfänglich für die Krankheit Leptospirose eingestuft. In experimentellen Studien blieben die Studienpatienten trotz nachgewiesener Infektion zumeist asymptomatisch oder zeigten nur sehr leichte Symptome (PU/PD, leicht erhöhte Körpertemperatur) (FESSLER & MORTER, 1964; SHOPHET & MARSHALL, 1980; LARSSON et al., 1985). Dennoch gibt es mehrere Fallberichte von Katzen, die an Leptospirose erkrankt waren (BRYSON & ELLIS, 1976; ARBOUR et al., 2012; BEAUDU-LANGE & LANGE, 2014). Es gibt mehrere Parallelen in diesen Fallberichten. Die Autoren berichten zumeist von einer leichten Erkrankung mit unspezifischen Symptomen (Anorexie und Apathie) und später auftretenden Anzeichen einer Niereninsuffizienz (PU/PD). Durch intravenöse Flüssigkeitssubstitution und die Gabe von Antibiotika verschwanden die Symptome rasch. Es ist anzunehmen, dass in der Praxis aufgrund der unspezifischen Symptome differentialdiagnostisch

oft nicht an feline Leptospirose gedacht wird. Außerdem bewirkt die rasche Besserung nach symptomatischer Therapie, dass kaum weitere Diagnostik (MAT oder PCR) eingeleitet wird. Möglicherweise wird die feline Leptospirose daher in der Praxis oft übersehen.

Interessant ist auch, dass die Leptospirose bei Katzen eine längere Inkubationszeit hat als bei Hunden (ARBOUR et al., 2012). In zwei von drei Fällen zeigten Katzen erst Monate nach einer Infektion die ersten Symptome der Erkrankung. Ein Hund hingegen erkrankt typischerweise schon etwa eine Woche nach der Infektion (GEISEN, 2009). Dieser Unterschied könnte erklären, warum die Katzen nach experimentellen Infektionen während des oftmals sehr kurzen Studienzeitrahmens asymptomatisch blieben. Es ist möglich, dass einige Katzen erst nach Abschluss der Studie die ersten Symptome entwickelten (ARBOUR et al., 2012).

In der vorliegenden Studie schieden 3,3 % (sieben von 215 Katzen; 95 % CI: 0,9–5,7) der untersuchten Freigängerkatzen DNA pathogener Leptospiren über den Urin aus. Katzen verbreiten somit Leptospiren in der Umgebung und eine Übertragung auf den Menschen ist denkbar. Eine aktuelle Studie aus Deutschland zeigte allerdings, dass Forstmitarbeiter mit Kontakt zu Freigängerkatzen kein erhöhtes Risiko hatten, Antikörper zu entwickeln (JURKE et al., 2015). In Baltimore, USA, hatten Menschen, welche mit Katzen zusammenleben, sogar seltener Antikörper gegen Leptospiren als Menschen ohne Kontakt zu Katzen (CHILDS et al., 1992). Katzen fressen Nagetiere, welche ein Reservoir für Leptospiren darstellen. Dadurch könnte der Kontakt von Menschen zu den Reservoirwirten und die kontinuierliche Verbreitung der Leptospiren in der Umwelt durch die Reservoirwirte minimiert werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Leptospiren kommen weltweit vor und sind für die meisten Wirbeltiere infektiös. Katzen können sich mit Leptospiren infizieren, Antikörper bilden und Leptospiren über den Urin ausscheiden. Erkrankungen sind jedoch selten. Es gibt keine Studien zur Prävalenz der Leptospirurie bei Katzen in Deutschland. Die letzte publizierte Studie zur Antikörperprävalenz bei Katzen in Deutschland ist fast 30 Jahre alt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Antikörperprävalenz und die DNA-Ausscheidung pathogener *Leptospira* spp. über den Urin bei Katzen in Deutschland zu untersuchen. In die Studie wurden prospektiv 215 Katzen eingeschlossen, welche zwischen Juli 2013 und März 2015 an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München vorgestellt wurden. Reine Wohnungskatzen und Katzen, welche innerhalb der letzten vier Wochen vor Vorstellung antibiotisch behandelt waren, wurden ausgeschlossen. Serumproben wurden mittels MAT auf acht Serovare untersucht (Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Pomona, Saxkoebing), welche zu sieben Serogruppen gehören (Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe). Urinproben wurden mittels Zystozentese, Harnkatheter oder durch Auffangen gewonnen und innerhalb von 24 Stunden zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer gelöst und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Die DNA wurde mittels Qiagen DNA Micro Kit nach Herstellerangabe extrahiert und mittels Eppendorf D30 Biophotometer quantifiziert. Es wurde eine *lipL32*-qPCR nach STODDARD durchgeführt (STODDARD et al., 2009). Eine Standardkurve mit einer Verdünnungsreihe von *L. interrogans* Serovar Bratislava, Ballum und Grippotyphosa von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^2$  Leptospiren/ml wurde zum Quantifizieren der positiven Proben erstellt. Insgesamt schieden sieben von 215 Katzen DNA pathogener Leptospiren aus (3,3 %; 95 % CI: 0,9–5,7). Die Menge der ausgeschiedenen Leptospiren reichte von 393 Leptospiren/ml bis 15.760 Leptospiren/ml. Bei einer PCR-positiven Katze wurde acht Monate nach Erstvorstellung erneut Leptospiren-DNA im Urin nachgewiesen. Ein Antikörper-Titer  $\geq 1:100$  gegen mindestens ein Serovar wurde bei 35 von 195 Katzen festgestellt (17,9 %; 95 % CI: 12,5–23,3). Die am häufigsten nachgewiesenen Serogruppen waren Australis und Grippotyphosa. Freigängerkatzen in Deutschland können sich somit mit Leptospiren infizieren

---

und den Erreger über den Urin ausscheiden und könnten somit eine Infektionsquelle für andere Tiere und den Menschen darstellen.

## VI. SUMMARY

Leptospirosis is a widespread disease caused by pathogenic *Leptospira* spp. that can be found in almost all vertebrates. Although there is evidence of exposure of cats to leptospires, there are only a few reports of clinical leptospirosis in cats. No study evaluating the prevalence of leptospiruric cats in Germany exists so far. The last published study that examined prevalence of antibodies against leptospires in Germany is almost 30 years old. Therefore, the objective of this study was to evaluate urinary shedding of DNA from pathogenic *Leptospira* spp. and prevalence of antibodies in cats with outdoor access in Germany. Two hundred fifteen cats that were presented to the clinic of Small Animal Medicine in Munich from July 2013 to March 2015 were included prospectively. Indoor cats and cats that had been treated with antibiotics four weeks prior to presentation were excluded. Eight different serovars (Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Pomona, Saxkoebing) belonging to seven serogroups (Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe) were tested by MAT. Urine samples were collected via cystocentesis, urinary catheter or free catch and centrifuged within 24 hours of collection. The pellet was suspended in buffer and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further preparation. The DNA was extracted using the Qiagen DNA Micro Kit following the manufacturer's instructions and quantified using the Eppendorf D30 Biophotometer. QPCR targeting the *lipL32* gene of pathogenic *Leptospira* spp. after STODDARD et al. was performed (STODDARD et al., 2009). A standard curve with a ten-fold dilution of  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^2$  leptospires/ml of *L. interrogans* serovars Bratislava, Ballum and Grippotyphosa was generated to quantify the positive samples. Seven out of 215 cats shed DNA from pathogenic *Leptospira* spp. in their urine (3.3 %; 95 % CI: 0.9–5.7). Concentration of leptospires in urine ranged from 393 to 15,760 leptospires/ml. One PCR-positive cat had a PCR-positive follow-up urine sample eight months after the first presentation. MAT testing revealed antibody titers of  $\geq 1:100$  in 35 out of 195 cats (17.9 %; 95 % CI: 12.5–23.3). Australis and Grippotyphosa were the most common serogroups. In conclusion, outdoor cats in Germany can shed DNA from pathogenic *Leptospira* spp. Therefore, outdoor cats should be considered as a possible source of infection for other animals and humans.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 2010; 140: 287-96.

Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. J Small Anim Pract 1996; 37: 126-9.

Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. PLoS One 2009; 4: e7093.

Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5: 28.

Andre-Fontaine G. Canine leptospirosis - do we have a problem? Vet Microbiol 2006; 117: 19-24.

Arbour J, Blais MC, Carioto L, Sylvestre D. Clinical leptospirosis in three cats (2001-2009). J Am Anim Hosp Assoc 2012; 48: 256-60.

Ayral F, Zilber A-L, Bicout DJ, Kodjo A, Artois M, Djelouadji Z. Distribution of *Leptospira interrogans* by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*): A Survey in France in 2011-2013. PLoS One 2015; 10: e0139604.

Azocar-Aedo L, Smits HL, Monti G. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. Arch Med Vet 2014; 46: 337-48.

Azócar-Aedo L, Monti G, Jara R. *Leptospira* spp. in domestic cats from different environments: prevalence of antibodies and risk factors associated with the

seropositivity. *Animals* 2014; 4: 612-26.

Backstedt BT, Buyuktanir O, Lindow J, Wunder EA, Jr., Reis MG, Usmani-Brown S, Ledizet M, Ko A, Pal U. Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. *PLoS One* 2015; 10: e0128913.

Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1894-8.

Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Goncales AP, Silva AS, Daha MR, Isaac L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun* 2009; 77: 1137-43.

Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1780-4.

Bätza HJ, Weiss R. Zum Vorkommen von *Leptospira*-Antikörpern in Katzenserum [in German]. *Kleintierpraxis* 1987; 32: 171-2.

Beaudu-Lange C, Lange E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. *Rev Vet Clin* 2014; 49: 115-22.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757-71.

Brendle JJ, Rogul M, Alexander AD. Deoxyribonucleic-acid hybridization among selected leptospiral serotypes. *Int J Syst Bacteriol* 1974; 24: 205-14.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS.

Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 839-58.

Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S, Hartelt K, Luge E, Nockler K, Schneider T, Stark K, Jansen A. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. BMC Infect Dis 2010; 10: 91.

Bryson DG, Ellis WA. Leptospirosis in a British domestic cat. J Small Anim Pract 1976; 17: 459-65.

Buckwalter SP, Sloan LM, Cunningham SA, Espy MJ, Uhl JR, Jones MF, Vetter EA, Mandrekar J, Cockerill FR, Pritt BS, Patel R, Wengenack NL. Inhibition controls for qualitative real-time PCR assays: are they necessary for all specimen matrices? J Clin Microbiol 2014; 52: 2139-43.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Robert-Koch-Institut. Mitteilung Nr. 040/2014 des BfR und des RKI vom 28. Oktober 2014.

Burgdorfer W. The possible role of ticks as vectors of *Leptospirae*. I. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. Exp Parasitol 1956; 5: 571-9.

Burgdorfer W. The possible role of ticks as vectors of *Leptospirae*. II. Infection of the ixodid ticks, *Dermacentor andersoni* and *Amblyomma maculatum*, with *Leptospira pomona*. Exp Parasitol 1959; 8: 502-8.

Chan KW, Hsu YH, Hu WL, Pan MJ, Lai JM, Huang KC, Chou SJ. Serological and PCR detection of feline *Leptospira* in Southern Taiwan. Vector Borne Zoonotic Dis 2014; 14: 118-23.

Charon NW, Cockburn A, Li C, Liu J, Miller KA, Miller MR, Motaleb MA,



Wolgemuth CW. The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66: 349-70.

Childs JE, Schwartz BS, Ksiazek TG, Graham RR, LeDuc JW, Glass GE. Risk factors associated with antibodies to leptospires in inner-city residents of Baltimore: a protective role for cats. *Am J Public Health* 1992; 82: 597-9.

Chong S, Mahony JB, Jang D, Luinstra K, Chernesky M. Inhibitors of *Chlamydia trachomatis* PCR in urine [abstract]. In 64th Conjoint Meeting on Infectious Diseases. 1996.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0003898.

Desvars A, Naze F, Benneveau A, Cardinale E, Michault A. Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). *Epidemiol Infect* 2013; 141: 1154-65.

Essevald H, Collier WA. Leptospirosis of cats in Java. *Z Immun Forsch* 1938; 93: 512.

Everard CO, Fraser-Chanpong GM, James AC, Butcher LV. Serological studies on leptospirosis in livestock and chickens from Grenada and Trinidad. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 859-64.

Faine S. Leptospirosis - here, now. *Pathology* 1981; 13: 1-5.

Fenimore A, Carter K, Lunn KF. Detection of leptospirosis in shelter cats in Colorado [abstract]. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 783.

Fenimore A, Lunn K, Bennett S, Reagan KL, Lappin MR. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo-prajitno DNA in the urine of a cat in Colorado [abstract]. *J Vet*

Intern Med 2013; 27: 726.

Fessler JF, Morter RL. Experimental feline leptospirosis. Cornell Vet 1964; 54: 176-90.

Fink JM, Moore GE, Landau R, Vemulapalli R. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine. J Vet Diagn Invest 2015; 27: 159-66.

Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4: e612.

Gay N, Soupe-Gilbert ME, Goarant C. Though not reservoirs, dogs might transmit *Leptospira* in New Caledonia. Int J Environ Res Public Health 2014; 11: 4316-25.

Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller W, Greene C, Hartmann K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). J Small Anim Pract 2007; 48: 324-8.

Geisen V, Stengel C, Hartmann K. Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland. Tierärztliche Praxis Kleintiere 2008; 36: 329-36.

Geisen V. Leptospirose bei Hunden in Süddeutschland [thesis in German]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2009.

Gordon Smith CE, Turner LH, Harrison JL, Broom JC. Animal leptospirosis in Malaya: 1. Methods, zoogeographical background, and broad analysis of results. Bull World Health Organ 1961; 24: 5-21.

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of

pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol 1993; 139: 1691-700.

Greene CE, Sykes JE, Brown CA, Hartmann K. Leptospirosis. In: Greene CE (ed). Infectious diseases of the Dog and Cat, 3rd edn. Greene CE, ed. Philadelphia: WB Saunders 2006: 402-17.

Haapala DK, Rogul M, Evans LB, Alexander AD. Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of *Leptospira*. J Bacteriol 1969; 98: 421-8.

Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. J Am Vet Med Assoc 2003; 222: 1224-9.

Harkness AC, Smith BL, Fowler GF. An isolation of *Leptospira* serotype Pomona from domestic cat. N Z Vet J 1970; 18: 175-6.

Hartmann K, Hein J. Leptospirose. In: Infektionskrankheiten der Katze [in German], ed. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG 2008: 219-21.

Hartmann K, Egberink H, Pennisi MG, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Möstl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg 2013; 15: 576-81.

Hartskeerl RA. Leptospirosis: current status and future trends. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 309.

Hathaway SC, Blackmore DK. Failure to demonstrate the maintenance of leptospires by free-living carnivores. N Z Vet J 1981; 29: 115-6.

Hoenigl M, Wallner C, Allerberger F, Schmoll F, Seeber K, Wagner J, Valentin T, Zollner-Schwetz I, Flick H, Krause R. Autochthonous leptospirosis in South-East Austria, 2004-2012. PLoS One 2014; 9: e85974.

Inada R, Ido Y. A report on the discovery of the causative organism (a new species of *Spirochaeta*) of Weil's disease (in Japanese). Tokyo Ijishinshi (Tokyo Med J) 1915; 1908: 351-60.

Jacobs JW, Korver H, Terpstra WJ. Leptospirosis in a poultry slaughterhouse [in Dutch]. Ned Tijdschr Geneesk 1986; 130: 1367-9.

Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1048-54.

Johnson RC, Rogers P. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. J Bacteriol 1964; 88: 1618-23.

Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires I. Growth at low temperatures. J Bacteriol 1967; 94: 27-31.

Jurke A, Bannert N, Brehm K, Fingerle V, Kempf VA, Kompf D, Lunemann M, Mayer-Scholl A, Niedrig M, Nockler K, Scholz H, Splettstoesser W, Tappe D, Fischer SF. Serological survey of *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Leptospira* spp., *Echinococcus*, Hanta-, TBE- and XMR-virus infection in employees of two forestry enterprises in North Rhine-Westphalia, Germany, 2011-2013. Int J Med Microbiol 2015; 305: 652-62.

Klopfleisch R, Kohn B, Plog S, Weingart C, Nockler K, Mayer-Scholl A, Gruber AD. An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? Vet Med Int 2010; 2010: 928541.

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. J Infect Chemother 2001; 7: 10-5.

Krepkogorskaia TA, Rementsova MM. Isolation of *Leptospira* strains from the tick *Dermacentor marginatus* S. removed from big horned cattle [in Russian]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1957; 28: 93-4.

Lapointe C, Plamondon I, Dunn M. Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. Can Vet J 2013; 54: 497-9.

Larsson CE, Santa Rosa CA, Hagiwara MK, Paim GV, Guerra JL. Prevalence of feline leptospirosis: serologic survey and attempts of isolation and demonstration of the agent. Int J Zoonoses 1984; 11: 161-9.

Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, Birgel EH, Fernandes WR, Paim GV. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. Int J Zoonoses 1985; 12: 111-9.

Levesque B, De Serres G, Higgins R, D'Halewyn MA, Artsob H, Grondin J, Major M, Garvie M, Duval B. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Quebec, Canada. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2: 496-8.

Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 296-326.

Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clin Infect Dis 2003; 36: 447-52.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 671-3.

Lindtner-Knific R, Vergles-Rataj A, Vlahovic K, Zrimsek P, Dovc A. Prevalence

of antibodies against *Leptospira* sp. in snakes, lizards and turtles in Slovenia. Acta Vet Scand 2013; 55: 65.

Llewellyn JR, Krupka-Dyachenko I, Rettinger AL, Dyachenko V, Stamm I, Kopp PA, Straubinger RK, Hartmann K. Urinary shedding of leptospires and presence of *Leptospira* antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2015; in press.

Luciani O. Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospires [thesis in French]. Nantes: École Nationale Vétérinaire; 2004.

Mahony J, Chong S, Jang D, Luinstra K, Faught M, Dalby D, Sellors J, Chernesky M. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. J Clin Microbiol 1998; 36: 3122-6.

Markovich JE, Ross L, McCobb E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts. J Vet Intern Med 2012; 26: 688-9.

Martin L, Pettit A. Serodiagnostic de la spirochaetose ictero-haémorragique [in French]. Bull. Mem. Soc. Med. Hop Paris 1918: 672-5.

Martin LE, Wiggans KT, Wennogle SA, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin MR. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. J Vet Intern Med 2014; 28: 789-92.

Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e213.

Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nockler K, Kohn B. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 2013; 13: 200-2.

Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, Scholz HC, Thomas A, Nockler K. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. Int J Environ Res Public Health 2014; 11: 7562-74.

Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol 1992; 30: 2219-24.

Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995; 172: 281-5.

Mertens WK. Over het voorkomen van *Leptospira icterohaemorrhagiae* bij katten [in Dutch]. Ned indische Bl Diergeneesk 1938; 50: 78-9.

Millan J, Candela MG, Lopez-Bao JV, Pereira M, Jimenez MA, Leon-Vizcaino L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. Vector Borne Zoonotic Dis 2009; 9: 549-54.

Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. J Vet Intern Med 2011; 25: 426-32.

Minette HP. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. Int J Zoonoses 1983; 10: 111-21.

Munoz-Zanzi C, Mason M, Encina C, Gonzalez M, Berg S. Household characteristics associated with rodent presence and *Leptospira* infection in rural and urban communities from Southern Chile. Am J Trop Med Hyg 2014a; 90:

497-506.

Munoz-Zanzi C, Mason MR, Encina C, Astroza A, Romero A. *Leptospira* contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile. Int J Environ Res Public Health 2014b; 11: 6666-80.

Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF, Petridou E, Saridomichelakis MN, Leontides L, Siochu A. Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. Vet Rec 2005; 156: 615-6.

Nervig RM, Garrett LA. Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. Am J Vet Res 1979; 40: 1197-200.

Neumeister B, Geiss H, Braun R, Kimmig P. Molekulare Diagnostik. In: Mikrobiologische Diagnostik [in German], 2nd edn., ed. Stuttgart: Thieme Verlag KG 2009: 224-58.

Obrenovic S, Radojicic S, Stevic N, Bogunovic D, Vakanjac S, Valcic M. Seroprevalence of cat leptospirosis in Belgrade (Serbia). Acta Vet Beograd 2014; 64: 510-8.

Perolat P, Grimont F, Regnault B, Grimont PA, Fournie E, Thevenet H, Baranton G. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. Res Microbiol 1990; 141: 159-71.

Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbes Infect 2000; 2: 1265-76.

Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 215-9.

Reilly GA, Bailie NC, Morrow WT, McDowell SW, Ellis WA. Feline stillbirths



associated with mixed *Salmonella typhimurium* and *Leptospira* infection. Vet Rec 1994; 135: 608.

Rettinger A. Anwendbarkeit der Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) für den Nachweis und die Differenzierung von *Leptospira* spp. im Vergleich zum Multilocus Sequence Typing (MLST) [thesis in German]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2013.

Robert-Koch-Institut. Leptospirose. In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011 [in German]. AZ Druck und Datentechnik GmbH, Berlin; 2012.

Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L, Harel J. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. J Vet Intern Med 2014; 28: 284-93.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29: 1305-9.

Rose L, Mayer-Scholl A, Luge E, Merle R, Nöckler K, Kohn B. Leptospiroseinfektion bei Katzen - eine Prävalenzstudie [in German]. Tierärztliche Praxis, Kleintiere 2016; 1/2016: 10.

Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J Small Anim Pract 2015; 56: 159-79.

Semmel M. Über das Vorkommen von Leptospirose bei Katzen in München und Umgebung [thesis in German]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 1954.

Shophet R. A serological survey of leptospirosis in cats. N Z Vet J 1979; 27: 236,

45-6.

Shophet R, Marshall RB. An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. Br Vet J 1980; 136: 265-70.

Shropshire SB, Veir JK, Morris AK, Lappin MR. Evaluation of the *Leptospira* species microscopic agglutination test in experimentally vaccinated cats and *Leptospira* species seropositivity in aged azotemic client-owned cats. J Feline Med Surg. Epub ahead of print 13 July 2015. DOI: 0.1177/1098612X15593902 2015.

Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, Chaicumpa W, Bunyaraksyotin G, Craig S, Harrower BJ, Smythe LD. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58: 2305-8.

Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, Bahaman AR, Craig S, Harrower BJ, Smythe LD. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59: 705-8.

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis 2002; 2: 13.

Statista. Anzahl der Haustierbesitzer in Deutschland nach Haustierarten (Hunde, Katzen, Vögel, Nagetiere) von 2010 bis 2014 (in Millionen) [in German]. <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/182518/umfrage/besitzer-von-haustieren-nach-haustierart/>; 02.09.2015.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64: 247-55.

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. J Vet Intern Med 2011; 25: 1-13.

Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, Smythe LD, Limpai boon R, Hoffmaster AR, Day NPJ, Peacock SJ. Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and lipL32 Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. PLoS One 2011; 6: e16236.

Toye B, Woods W, Bobrowska M, Ramotar K. Inhibition of PCR in Genital and Urine Specimens Submitted for *Chlamydia trachomatis* Testing. J Clin Microbiol 1998; 36: 2356-8.

Truong QL, Seo TW, Yoon BI, Kim HC, Han JH, Hahn TW. Prevalence of swine viral and bacterial pathogens in rodents and stray cats captured around pig farms in Korea. J Vet Med Sci 2013; 75: 1647-50.

Victoriano AFB, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong BL, Gongal G, Hall J, Coulombe CA, Yanagihara Y, Yoshida S-i, Adler B. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infect Dis 2009; 9: 147.

Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. J Microbiol Methods 2012; 91: 184-90.

Vysotoski BV, Malykh FS, Prokof'ev AA. Leptospirosis in cats [in Russian]. Zh Mikrobiol Epidemiol I Immunobiol Mosuova 1960; 2: 140.

Wasinski B, Dutkiewicz J. Leptospirosis - current risk factors connected with human activity and the environment. Ann Agric Environ Med 2013; 20: 239-44.

Weil A. Über eine eigentümliche, mit Milztumor, Ikterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit [in German]. Dtsch Arch f Klin Med 1886; 39: 209-19.

Weingart C, Kohn B. Leptospirose. In: Niemand HG, Suter PF, Kohn B, Schwarz G. (ed). Praktikum der Hundeklinik [in German], 11th edn. Niemand HG, Suter PF, Kohn B, Schwarz G., ed. Stuttgart: Enke 2011: 331-4.

Wojcik-Fatla A, Zajac V, Cisak E, Sroka J, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Leptospirosis as a tick-borne disease? Detection of *Leptospira* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in eastern Poland. Ann Agric Environ Med 2012; 19: 656-9.

Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett 1997; 150: 9-18.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic-acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for 7 new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol 1987; 37: 407-15.

Zmudzki J, Jablonski A, Nowak A, Zebek S, Arent Z, Bocian L, Pejsak Z. First overall report of *Leptospira* infections in wild boars in Poland. Acta Vet Scand 2016; 58: 3.

## VIII. DANKSAGUNG

In erster Linie danke ich Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Überlassung dieses spannenden Themas, das mir sehr viel Freude bereitet hat. Ich danke für die gute Zusammenarbeit und Betreuung sowie für die Möglichkeit und das Vertrauen, eigenständig Ideen umsetzen zu dürfen.

Bei Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger und Dr. Anna Rettinger vom Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie bedanke ich mich herzlich für die gute Betreuung und die ständige und unermüdliche Bereitschaft bei Problemen und Fragestellungen zu helfen.

Ich danke Dr. Michele Bergmann für die jederzeit gewährte Unterstützung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an IDEXX GmbH für die gute Zusammenarbeit und die rasche und zuverlässige Untersuchung der Serumproben.

Danke außerdem allen Autoren des Manuskriptes für gute Ideen und Hinweise, die die Publikation und die Studie verbessert haben.

Ein Dank gilt auch Dr. Sven Reese vom Lehrstuhl für Anatomie für die kompetente und hilfreiche statistische Beratung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik für eine schöne Zeit, das freundliche Miteinander und die Hilfe beim Sammeln von Proben.

Von ganzen Herzen danke ich meiner Mutter für die Unterstützung und Hilfe, die sie mir immer und uneingeschränkt entgegenbringt. Tausend Dank auch meinem Freund, der immer Verständnis und ein offenes Ohr für mich hat und mir mit guten Ratschlägen zur Seite steht. Ich danke auch meinen Freunden, auf die ich mich immer verlassen kann.